



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENOESPÉCIES DO COMPLEXO *Borrelia burgdorferi*
sensu lato (s.l.) CIRCULANTES NA FAUNA IXODIDEOLÓGICA EM
PORTUGAL**

NÁDIA TERESA COELHO LOPES

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

SETEMBRO DE 2013



**IDENTIFICAÇÃO DE GENOESPÉCIES DO COMPLEXO *Borrelia burgdorferi*
sensu lato (s.l.) CIRCULANTES NA FAUNA IXODIDEOLÓGICA EM
PORTUGAL**

NÁDIA TERESA COELHO LOPES

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientadora: Investigadora Auxiliar Doutora Maria Luísa Vieira, Diretora da Unidade de Microbiologia Médica e responsável do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa.

SETEMBRO DE 2013

Parte dos resultados incluídos na presente Dissertação foram apresentados sob a forma de poster e comunicação oral, nas seguintes reuniões científicas/congressos no decurso dos anos 2012 e 2013:

Nunes, M., **Lopes, N.**, Inácio, J., Almeida, P., Vieira, M.L. (2012). Avaliação da distribuição e diversidade das genoespécies de *Borrelia burgdorferi* s.l. em Portugal, através do desenvolvimento de novas técnicas moleculares. III Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL), em 12 de dezembro de 2012. *In Abstract Book*, pág. 49-50.

Disponível em: <http://www.ihmt.unl.pt/biblioteca/3Jornada/index.html#/49/zoomed>.

Lopes, N., Nunes, M., Almeida, P., Vieira, M.L. (2013). Warning: ticks alert!!! Find out which ticks surround us and their relationship with Lyme Borreliosis. Congresso de Microbiologia e Biotecnologia, “MicroBiotec’13”, organizado pela Sociedade Portuguesa de Microbiologia (SPM) e Sociedade Portuguesa de Biotecnologia (SPBT), Universidade de Aveiro, 6 a 8 de dezembro de 2013. *In Abstract Book*, pág. 216; Poster 170 (*Microbiol Ecology session*).

Nunes, M., **Lopes, N.**, Inácio, J., Vieira, M.L. (2013). Development of real-time PCR targeting the *flagellin* gene for the identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies. Congresso de Microbiologia e Biotecnologia, “MicroBiotec’13”, organizado pela SPM e SPBT, Universidade de Aveiro, 6 a 8 de dezembro de 2013. *In Abstract Book*, pág. 350; Poster 277 (*Molecular Microbiology session*).

Mónica Nunes, **Nádia Lopes**, Carla Maia, Teresa Carreira, Paulo Almeida, João Inácio, Maria Luísa Vieira. (2013). Presença dos agentes da doença de Lyme na ixodofauna portuguesa: determinação de taxa de infeção. IV Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL), em 13 de dezembro de 2013. CO pelo 1º autor. *In Abstract Book*, disponível em:

http://www.ihmt.unl.pt/images/uploaded/news/Indice%20Geral%20Resumos%202013_2.pdf.

Abstract submetido:

Mónica Nunes, **Nádia Lopes**, Teresa Carreira, Maria Luísa Vieira. Presence of Lyme disease agents in the Portuguese ixodofauna: development of real-time PCR assays for the identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), in Barcelona, Spain, 10 – 13 May 2014.

Colaboração na componente laboratorial do trabalho conducente ao seguinte artigo:

Carla Maia, Andreia Ferreira, Mónica Nunes, M Luísa Vieira, Lenea Campino, Luís Cardoso. *Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks in Portugal*. (Submetido a *TTBDis*, em nov’2013).

AGRADECIMENTOS

Ao terminar mais uma etapa tão importante da minha carreira académica e científica, quero agradecer:

À Inv.^a Doutora Maria Luísa Vieira, orientadora desta Dissertação de Mestrado, por toda a simpatia e amabilidade com que me recebeu na sua equipa, por ter orientado o trabalho conducente à dissertação, e pelo seu precioso apoio, ensinamento e incentivo, que tanto contribuíram para o meu enriquecimento pessoal, académico e científico.

Ao Grupo de Leishmanioses (Unidade de Parasitologia Médica) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), em particular à Doutora Carla Maia, por ceder gentilmente parte das amostras usadas neste estudo, e também pelo seu apoio, simpatia e profissionalismo.

Às minhas queridas amigas e colegas do dia-a-dia no laboratório Mestre Teresa Carreira, Mestre Vanessa Azevedo e Elsa Estanislau, por todo o apoio, companheirismo e amizade com que me receberam e acolheram, ajudando a minha integração na equipa.

À minha querida tutora e amiga, Mestre Mónica Nunes, por toda a orientação, conhecimentos e ajuda que me prestou durante este ano, grande companheira de secretária, de laboratório e de trabalho de campo, com quem percorri este Portugal de norte a sul em capturas. Sem o seu precioso contributo, a realização deste trabalho não teria sido possível.

Aos meus queridos pais, por todo o apoio, amor e amizade, e por todos os ensinamentos e bons valores que sempre me transmitiram. Por acreditarem sempre em mim, dando-me força para seguir em frente e nunca desistir de lutar pelos meus sonhos.

Por último, dedico esta tese ao meu querido e amado avô, Júlio Jacinto Coelho, meu amigo e “anjo protetor” em vida, e que sei que algures continua a olhar por mim. A ele dedico mais esta etapa da minha vida, pois ele foi sempre a minha inspiração e o meu exemplo de vida.

“Por todo o amor incondicional e verdadeiro, por todo o carinho e amizade que sempre me dedicaste, é para ti Avô Querido”.

RESUMO

Os ixodídeos (carraças) são responsáveis pela transmissão de agentes patogénicos causadores de diversas doenças emergentes de grande importância em Saúde Pública, afetando humanos e/ou animais, como a Borreliose de Lyme (BL).

Em Portugal, existem condições favoráveis para a manutenção e distribuição quer das carraças, quer dos agentes patogénicos. São exemplo disso, as espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l.*), agentes da BL, cujo principal vetor na Europa são as carraças da espécie *Ixodes ricinus*. Apesar da doença ser subdiagnosticada e subnotificada, vários estudos têm confirmado a circulação destas espiroquetas nas populações de carraças em diversas regiões.

O principal objetivo deste estudo consistiu na recolha e identificação de ixodídeos, de animais e da vegetação, em nove distritos de Portugal continental e determinação das respetivas taxas de infeção por *B.b.s.l.*, contribuindo para o conhecimento da fauna ixodideológica e da epidemiologia da BL.

As carraças capturadas foram identificadas taxonomicamente e o DNA borreliano foi detetado por duas abordagens de *nested*-PCR, tendo como alvos o espaço intergénico 5S-23S rRNA e o gene *flaB*. Para a identificação das espécies de *B.b.s.l.* recorreu-se às técnicas de RFLP e sequenciação.

Neste estudo capturaram-se 4487 carraças pertencentes aos géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Dermacentor*. Em 704 ixodídeos analisados, a taxa de infeção foi de 4,8%, maioritariamente em ninfas da espécie *I. ricinus*, sendo *B. garinii* a genoespécie mais prevalente.

Este estudo também permitiu, iniciar o desenvolvimento/otimização de uma técnica de PCR em tempo real (qPCR) TaqMan[®], tendo com alvo o gene *flaB*, para a deteção e quantificação das genoespécies europeias de *B.b.s.l.* mais prevalentes.

Embora se encontre ainda em desenvolvimento, esta técnica de qPCR parece ser uma ferramenta muito promissora na identificação e quantificação de espécies de *B.b.s.l.*, contribuindo para um diagnóstico mais rápido e eficiente da doença de Lyme.

ABSTRACT

Ticks are responsible for transmitting pathogenic agents of several emerging diseases of great Public Health importance, affecting humans and/or animals, like Lyme Borrelioses (LB).

In Portugal, there are favorable climatic conditions to the maintenance and distribution of ticks and pathogenic agents. An example of that are the spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l.*) complex, the agents of LB, which main vector in Europe are ticks of *Ixodes ricinus* species. Although this disease is underdiagnosed and underreported, several studies have confirmed the circulation of these spirochetes in tick populations from different areas.

The main aim of this study was to collect and identify ticks from animals and vegetation, in nine sites of Portugal, and to determine *B.b.s.l.* infection rate in the captured ticks, contributing to update tick's fauna and LB epidemiology.

Captured ticks were identified taxonomically and *B.b.s.l.* DNA was detected by two different nested-PCR protocols, targeting the intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA and the *flagellin* genes. The identification of species was performed by RFLP technique and sequencing.

In this study, 4,487 ticks were collected belonging to *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, and *Dermacentor* genera. From the 704 studied ticks, infection rate was 4.8%, the majority were *I. ricinus* nymphs, being *Borrelia garinii* the most prevalent species.

This study also allowed to start the development and optimization of a faster, sensitive and specific TaqMan[®] real time PCR protocol (qPCR), targeting *flaB* gene, for the detection and quantification of the most prevalent European pathogenic genospecies of *B.b.s.l.*

Although this research is still in ongoing, this qPCR seems to be a promising tool for the identification and quantification of *B.b.s.l.* species, contributing to a faster and more efficient diagnosis of Lyme disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA – Acrodermatite Crónica Atrófica
B.b.s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato
B.b.s.s. – *Borrelia burgdorferi* sensu strito
BL – Borreliose de Lyme
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – Albumina Sérica Bovina
BSK - Barbour-Stoenner-Kelly
CE – Controlo de Extração
CN – Controlo Negativo
CP – Controlo Positivo
DDO – Doença de Declaração Obrigatória
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
EM – Eritema Migratório
EUA – Estados Unidos da América
EUCALB - *European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*
IFA – *Indirect ImmunoFluorescence Assay* (Imunofluorescência Indireta)
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa)
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
MKP - Kelly-Pettenkofer modificado
Osp – *Outer surface protein*
PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)
qPCR – *quantification PCR*
QTB – Quinta da Torre Bela
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphisms*
rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal
TBE – Tris Borato EDTA
TNM – Tapada Nacional de Mafra

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xiii

I – INTRODUÇÃO

1. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS	1
2. CONTEXTO HISTÓRICO	3
2.1. O AGENTE – Bactérias do complexo <i>B.b.s.l.</i>	4
2.2. TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO	6
2.2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	8
3. CARRAÇAS – Vetores de Agentes Patogénicos	12
3.1. <i>Ixodes ricinus</i> – O VETOR DE <i>B.b.s.l.</i> NA EUROPA.....	16
3.1.1. CICLO DE VIDA DO VETOR <i>Ixodes ricinus</i>	17
3.1.2. TRANSMISSÃO E PATOGÉNESE.....	19
3.1.3. HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS	21
3.2. RISCO E PREVENÇÃO.....	23
4. <i>B.b.s.l. versus B. DE LYME</i>	24
4.1. ASPETOS CLÍNICOS	24
4.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	26
4.2.1. MÉTODOS DIRETOS.....	26
4.2.1.1. MICROSCOPIA.....	26
4.2.1.2. CULTURA EM MEIO SELETIVO.....	27
4.2.1.3. AMPLIFICAÇÃO DE DNA BORRELIANO	27
4.2.2 MÉTODOS INDIRETOS	28
4.2.2.1. SEROLOGIA	28
5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE GENOESPÉCIES	29
5.1. PCR EM TEMPO REAL	30

II – MATERIAL E MÉTODOS

1. LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	31
1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	31
1.2. POPULAÇÃO DE IXODÍDEOS	33
1.3. ELABORAÇÃO DE FICHA DE CAMPO	33
1.4. MÉTODOS DE CAPTURA NA VEGETAÇÃO	34
1.5. MÉTODOS DE CAPTURA NO HOSPEDEIRO ANIMAL	35
2. ATIVIDADE LABORATORIAL	36
2.1. IDENTIFICAÇÃO DE CARRAÇAS	36
2.2. MANUTENÇÃO DE ESTIRPES DE REFERÊNCIA DE <i>B.b.s.l.</i>	36
2.3. EXTRAÇÃO DE DNA DE CULTURA E DE AMOSTRAS HUMANAS	37
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA DE CARRAÇAS	37
2.5. DETECÇÃO DE DNA DE <i>B.b.s.l.</i>	39
2.5.1. <i>NESTED</i> -PCR	39
2.5.1.1. SENSIBILIDADE DA <i>NESTED</i> -PCR	42
2.5.1.2. GENOTIPAGEM POR RFLP	43
2.5.1.3. SEQUENCIAÇÃO	44
2.5.2. PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	45
2.5.2.1. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA qPCR	48
2.6. CONSENTIMENTO INFORMADO	48
3. ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS	48
3.1. AMOSTRAGEM	48
3.2. BASES DE DADOS	49
3.3. TRATAMENTO DE DADOS	49

III - RESULTADOS

1. POPULAÇÃO DE IXODÍDEOS	50
1.1. CAPTURAS NA VEGETAÇÃO	50
1.2. CAPTURAS NO HOSPEDEIRO ANIMAL	51
2. ATIVIDADE LABORATORIAL	52
2.2. DETECÇÃO DE DNA DE <i>B.b.s.l.</i>	55
2.2.1. SENSIBILIDADE DA <i>NESTED</i> -PCR	55
2.2.1.1. ANÁLISE DE CARRAÇAS POR <i>NESTED</i> -PCR	56
2.2.1.2. GENOTIPAGEM POR RFLP	58

2.2.1.3. SEQUENCIAÇÃO	60
2.2.2. qPCR	60
IV – DISCUSSÃO	63
V – CONCLUSÃO	73
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
VII - ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Dr. Willy Burgdorfer isola pela primeira vez o agente da Doença de Lyme em 1982.....	3
Figura 2: Estrutura e morfologia da bactéria <i>B.b.s.l.</i> A) microfotografia eletrónica.	4
Figura 3: Estrutura e morfologia da bactéria <i>B.b.s.l.</i> A) diagrama da bactéria; B) estrutura da bactéria e do flagelo	5
Figura 4: Representação esquemática do genoma das espiroquetas pertencentes ao complexo <i>B.b.s.l.</i>	6
Figura 5: Taxonomia da família Spirochaetaceae	7
Figura 6: Distribuição geográfica de genoespécies do complexo <i>B.b.s.l.</i>	8
Figura 7: Distribuição de <i>B.b.s.l.</i> na Europa, Norte de África e parte da Ásia. Espécies <i>major</i> incluem: <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi s.s.</i> , <i>B. lusitaniae</i> e, <i>B. valaisiana</i>	9
Figura 8: Representação taxonómica, mostrando a relação entre carrças e outros artrópodes	12
Figura 9: Estádios ativos de <i>Ixodidae</i> : espécimes de <i>Haemaphysalis punctata</i> . A e B adultos: A) macho e B) fêmea; C e D imaturos: C) ninfa e D) larva	13
Figura 10: Algumas espécies de carrças de corpo duro existentes em Portugal.....	15
Figura 11: Distribuição mundial das carrças, vetores de agentes da doença de Lyme	16
Figura 12: Fêmea de <i>Ixodes ricinus</i> , espécie vetor de <i>B.b.s.l.</i> na Europa.....	17
Figura 13: Ciclo de vida da carrça <i>I. ricinus</i>	18
Figura 14: Ciclo natural de infeção por <i>B.b.s.l.</i> : aquisição da bactéria e transmissão transestadial.	19
Figura 15: Representação esquemática da transmissão das espiroquetas ao hospedeiro	20
Figura 16: Reservatórios de <i>B.b.s.l.</i> : roedores, aves e répteis.....	22
Figura 17: O veado e outros cervos representam uma grande fonte de alimentação para a carrça <i>I. ricinus</i>	22
Figura 18: Representação esquemática da evolução da doença de Lyme	24
Figura 19: Representação esquemática do processo de inoculação das espiroquetas na pele e as principais localizações de infeção.....	25
Figura 20: Manifestações clínicas da BL.....	25
Figura 21: <i>B.b.s.l.</i> em cultura: observação por microscopia de fundo escuro	26
Figura 22: Representação esquemática da reação de qPCR utilizando sondas TaqMan®	30
Figura 23: Representação (a verde) dos distritos de Portugal continental onde se realizaram as capturas de carrças.....	31
Figura 24: Representação esquemática da influência do Atlântico e do Mediterrâneo no clima, e floresta no território continental.....	32
Figura 25: Fauna e flora característica da TNM	32
Figura 26: Exemplos de habitats de algumas áreas de estudo	33

Figura 27: Captura de carrças na vegetação: A) técnica da bandeira (<i>flagging</i>); B) arrastamento (<i>dragging</i>)	34
Figura 28: Colheita de carrças no hospedeiro animal: A) Gamo após o abate; B) Carrças engorgitadas e fixas ao hospedeiro	35
Figura 29: Observação de carrças ao estereomicroscópio e utilização de chaves dicotômicas para identificação da espécie	36
Figura 30: Extração de DNA de ixodídeos por hidrólise alcalina: ebulição a 100°C durante 20 minutos	38
Figura 31: Esquema representativo do espaço intergénico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rnl</i>) do rRNA de <i>B. burgdorferi</i> s.l. e amplicões obtidos nos dois passos da técnica de <i>nested</i> -PCR.....	40
Figura 32: Protocolo laboratorial para deteção e identificação de <i>B.b.s.l.</i> em amostras humanas e no vetor pela técnica de qPCR.....	46
Figura 33: Representação gráfica da distribuição do total de carrças ($N_C = 4487$) capturadas em cada um dos distritos seleccionados (maio de 2012 - junho de 2013).	50
Figura 34: Representação gráfica da variação de temperatura e humidade relativa registadas nos vários dias de captura de carrças na vegetação (maio de 2012 - junho 2013).	51
Figura 35: Representação gráfica da distribuição: A) de hospedeiros ($N_H = 150$), e B) de carrças ($N = 1704$) capturadas nos mesmos.....	51
Figura 36: Representação gráfica da distribuição das carrças capturadas ($N_C = 4487$) por género taxonómico.	52
Figura 37: Representação gráfica da distribuição das carrças ($N_C = 4487$) por espécie.	52
Figura 38: Representação gráfica da distribuição das carrças ($N_C = 4487$) por estádios de desenvolvimento: larvas, ninfas, e adultos (machos e fêmeas).	53
Figura 39: Representação gráfica da distribuição dos diferentes estádios de desenvolvimento de <i>I. ricinus</i> ($N_{Ir} = 1640$) de acordo com as estações do ano.	54
Figura 40: Representação gráfica da espécie <i>I. ricinus</i> ($N_{Ir} = 1640$) de acordo com os diferentes estádios de desenvolvimento (A), e por sexo (B).	55
Figura 41: Determinação da sensibilidade das duas técnicas de <i>nested</i> -PCR utilizadas	55
Figura 42: Representação gráfica da distribuição das espécies analisadas por <i>nested</i> -PCR.....	56
Figura 43: Gráfico de Venn representativo dos resultados obtidos pelas duas abordagens de <i>nested</i> -PCR	57
Figura 44: Padrões de restrição com a enzima <i>MseI</i> das estirpes de referência	58
Figura 45: Alguns padrões de restrição resultantes da análise por RFLP das amostras de ixodídeos.....	59
Figura 46: Resultados da RFLP das seis amostras humanas	59
Figura 47: Representação gráfica dos resultados da qPCR para o género.....	61

Figura 48: Representação gráfica dos resultados da qPCR para <i>B. burgdorferi</i> s.s	61
Figura 49: Representação gráfica dos resultados da qPCR para <i>B. afzelii</i>	62
Figura 50: Representação gráfica dos resultados da qPCR para <i>B. lusitaniae</i>	62

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Características biológicas mais importantes das carraças	13
Quadro 2: Géneros e espécies de <i>Ixodidae</i> existentes em Portugal	15
Quadro 3: Concentrações, volumes e condições de amplificação usadas na <i>nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA	40
Quadro 4: Concentrações, volumes e condições de amplificação usados na <i>nested</i> -PCR para o gene <i>flaB</i>	41
Quadro 5: Reagentes utilizados na preparação do gel de poliacrilamida (volumes e respetiva função).....	43
Quadro 6: Fragmentos de restrição das estirpes de referência utilizadas, obtidos por digestão dos produtos de <i>nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA com a enzima <i>MseI</i>	44
Quadro 7: Ensaio de qPCR, genes alvo e objetivo de cada ensaio.	45
Quadro 8: Condições para o desenvolvimento da técnica de RT-PCR.	46
Quadro 9: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> e sondas desenhados e utilizados como controlo interno da qPCR.	47
Quadro 10: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> e sondas desenhados para os ensaios qPCR Género e qPCR Genoespécies.....	47
Quadro 11: Cálculo do teste “kappa” (<i>k</i>)	49
Quadro 12: Espécies de ixodídeos capturadas em cada um dos nove distritos de Portugal continental.	53
Quadro 13: Espécies de ixodídeos recolhidas nos hospedeiros animais.	54
Quadro 14: Resultados obtidos pelas técnicas de <i>nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA e <i>flaB</i>	57
Quadro 15: Distribuição do número de positivos por <i>nested</i> -PCR de acordo com o estádio, espécie e origem de cada ixodídeo.	57
Quadro 16: Carraças cujos produtos de amplificação por <i>nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA foram analisados por sequenciação e resultados obtidos na mesma.....	60
Quadro 17: Valor do coeficiente de correlação (r^2) e eficiência (%).....	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Número de carraças <i>versus</i> estágio de desenvolvimento e volume de amónia usado na extracção de DNA.	38
Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados na <i>nested-PCR</i> do espaço intergénico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA, posições de homologia e dimensão dos produtos amplificados.....	39
Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados na <i>nested-PCR flaB</i>	41
Tabela 4: Distribuição das carraças analisadas por ambas as <i>nested-PCR</i> , de acordo com a espécie.....	56

I – INTRODUÇÃO

1. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS

As espiroquetas pertencentes ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l.*) causam uma doença multissistémica denominada Borreliose de Lyme (BL), ou Doença de Lyme (DL), com distribuição mundial (41, 89). Sendo a doença mais comum entre as que são causadas por agentes transmitidos por carraças (= ixodídeos), e tratando-se de uma zoonose, o ciclo de manutenção destas bactérias na natureza ocorre sobretudo em animais silváticos, podendo ser transmitidas acidentalmente aos humanos e infetar algumas espécies de animais domésticos (80, 83).

A infeção por *B.b.s.l.* tem sido reportada em várias regiões do mundo e estima-se que só na Europa ocorram cerca de 85 000 casos de BL por ano, e 16 000 - 20 000 casos nos Estados Unidos da América (EUA). Devido à ausência de notificação, o número total de casos de doença no mundo será muito superior, e admite-se que possa rondar os 255 000 por ano (62, 80).

A transmissão destes espiroquetídeos está associada a diferentes espécies de carraças, dependendo da região geográfica, sendo dada maior importância às carraças de corpo duro do género *Ixodes*. Na Europa, os principais vetores responsáveis pela transmissão destas bactérias são as carraças da espécie *Ixodes ricinus* (80).

O tratamento da BL é geralmente bem-sucedido através da administração de antibióticos durante a fase inicial da doença (80). Contudo, quando não tratada atempadamente, pode evoluir para infeção disseminada, atingindo vários órgãos e sistemas (75). Embora o diagnóstico da doença seja essencialmente clínico, a diversidade de sinais e sintomas, fazem da abordagem laboratorial uma importante ferramenta no auxílio do diagnóstico e terapêutica atempados (9).

Em Portugal, a BL [CID – 10: A69.2] é uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO), apesar de ser, muitas vezes, subnotificada. Vários estudos têm sido desenvolvidos com vista à implementação de tecnologias laboratoriais mais rápidas, sensíveis e específicas que detetem diretamente as bactérias pertencentes ao complexo *B.b.s.l.* quer em amostras biológicas quer nos vetores (9). Além disso, os mecanismos de manutenção e transmissão destas bactérias na natureza necessitam de ser clarificados. Do ponto de vista da Saúde Pública, o conhecimento da bioecologia dos vetores pode ajudar a compreender melhor as causas da variação da sua distribuição e respetiva taxa

de infeção, variáveis estas, diretamente associadas ao risco de BL para os humanos (41). Estudos mais aprofundados podem revelar-se indispensáveis para o desenvolvimento de programas de planeamento e controlo das carraças vetores, possibilitando o delineamento de zonas de potencial risco (71).

Por último, o facto de diferentes genoespécies de *B.b.s.l.* estarem associadas não só a diferentes manifestações clínicas nos humanos, como também revelarem predileção por diferentes reservatórios, faz com que a ecoepidemiologia da BL se revele extremamente complexa (45).

De forma a encontrar resposta para alguns dos aspetos acima referidos, o presente estudo teve como principal objetivo:

- Conhecer a atual distribuição e diversidade das genoespécies do complexo *B.b.s.l.* em Portugal, através do desenvolvimento de metodologias moleculares.

De forma a cumprir o presente objetivo para a presente dissertação, houve lugar à realização de trabalho de campo e de laboratório. Deste modo, considerou-se pertinente a formulação dos seguintes objetivos específicos:

- Capturar carraças do solo/vegetação e de animais (cães, bovinos, ovinos, gatos, gamos e veados) em diversas áreas de estudo, distribuídas por nove distritos de Portugal continental;
- Identificar morfológica e taxonomicamente os ixodídeos capturados, utilizando chaves dicotómicas em manuais de identificação e informatizadas;
- Otimizar uma técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo-real para a identificação e quantificação das espécies de *B.b.s.l.* mais prevalentes em Portugal e com maior impacto na BL.

Neste sentido, a diversidade de genoespécies de *B.b.s.l.* e de carraças vetores existentes, a complexidade dos ciclos de manutenção/transmissão da bactéria na natureza, assim como a diversidade e complexidade das manifestações clínicas em humanos, justificam plenamente a necessidade do desenvolvimento de estudos que contribuam não só para o conhecimento do risco de BL em determinadas regiões, mas também para uma prevenção e terapêutica mais eficazes.

2. CONTEXTO HISTÓRICO

Em 1975, a BL foi reconhecida pela primeira vez, na sequência de um surto de artrite reumatóide diagnosticada num vasto e invulgar número de crianças residentes na cidade de Lyme e em duas cidades vizinhas, pertencentes ao estado de Connecticut, EUA. Os primeiros sintomas de doença surgiam tipicamente durante o verão, época de maior atividade das carraças. Vários pacientes apresentavam lesões cutâneas antes do desenvolvimento da artrite, e alguns deles haviam sido mordidos por carraças. Após a exclusão de várias outras etiologias, os investigadores verificaram que a maioria das crianças afetadas habitava e frequentava áreas florestadas, pelo que focaram a sua atenção nas “carraças do veado” (49).

Paralelamente, nos laboratórios *Rocky Mountain* em Hamilton, Montana, pertencentes ao *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), o zoologista e microbiologista Dr. Willy Burgdorfer, colaborava com o Dr. Jorge Benach, na tentativa de encontrarem a causa de mais de 100 casos de febre maculosa ocorridos entre 1971 e 1976 em Nova Iorque. Enquanto especialista em doenças transmitidas por carraças, e tendo a sua formação académica incidido sobretudo no estudo da febre recorrente, o Dr. Burgdorfer é contactado no verão de 1977, pelo médico Allen C. Steere, envolvido na investigação dos casos de artrite na cidade de Lyme. Nesta conversa, o Dr. Steere alerta o Dr. Burgdorfer para o facto de a chamada “carraça do veado” poder ser o possível vetor do agente causal da DL (49).

Seguem-se alguns anos de estudos, e em 1982, o Dr. Willy Burgdorfer e colaboradores isolam pela primeira vez a bactéria agente causal da DL (Figura 1) a partir da “carraça do veado” *Ixodes dammini*, espécie atualmente denominada *I. scapularis*.



Figura 1: Dr. Willy Burgdorfer isola pela primeira vez o agente da Doença de Lyme em 1982 (49).

Para além de constatar que os soros dos doentes de Lyme apresentavam anticorpos que reagiam contra as espiroquetas encontradas nas referidas carraças, o Dr. Burgdorfer verifica que se trata de uma nova bactéria semelhante às espiroquetas causadoras da febre recorrente, a qual passa a designar-se por *Borrelia burgdorferi* (49, 62, 84, 89).

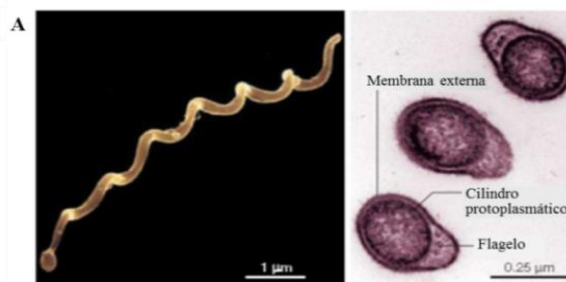
Em Portugal, o primeiro caso clínico de BL a ser diagnosticado ocorreu em 1989, na região de Évora, e ficou a dever-se a David Morais e colaboradores. Os mesmos autores, em estudos posteriores, confirmaram que a BL apresenta uma ocorrência generalizada no continente, verificando-se a maior exposição às carraças em área rural. Além disso, a ampla distribuição do vetor *I. ricinus* já foi confirmada como ectoparasita de animais domésticos em todo o País e em espécies silváticas (7).

Em 1993, em Portugal, foi isolada pela primeira vez a partir do vetor uma nova genoespécie do complexo *B.b.s.l.*, designada *B. lusitaniae*, e em 1999 a BL passou a ser considerada uma DDO (8). Mais tarde, em 2003, a Investigadora Margarida Collares-Pereira e a sua equipa obtiveram o primeiro isolado humano de *B. lusitaniae*, a partir de lesões cutâneas de uma doente (8, 68).

2.1. O AGENTE – Bactérias do complexo *B.b.s.l.*

Os membros do complexo *B.b.s.l.* são espiroquetas Gram negativas, microaerofílicas, móveis, longas (4 a 18 µm de comprimento), finas (0,2 a 0,5 µm de largura) e com forma helicoidal, apresentando menor número de espiras do que as espiroquetas do Género *Leptospira* (Figura 2) (29, 34, 72).

Figura 2: Estrutura e morfologia da bactéria *B.b.s.l.* A) microfotografia eletrónica. Adaptado de Rosa P. e col (2005) (61).



Estas espiroquetas vivem principalmente como agentes patogénicos extracelulares. São bactérias fastidiosas, de difícil isolamento *in vitro*, necessitando de meios de cultura altamente enriquecidos e com baixa tensão de oxigénio. O seu crescimento é lento, levando várias semanas até se desenvolver em cultura (3, 24, 76).

Os espiroquetídeos do complexo *B.b.s.l.* para além da membrana plasmática apresentam uma membrana lipídica externa, sendo o espaço existente entre ambas denominado periplasma. É neste espaço intermembranar que se situam entre sete a onze flagelos, denominados flagelos periplasmáticos (Figura 2) (29, 34, 72).

Os referidos flagelos de *B.b.s.l.* percorrem longitudinalmente o espaço periplasmático, têm origem em ambas as extremidades da célula bacteriana e encontram-se ancorados à membrana citoplasmática (Figura 3). Dispõem-se em torno do cilindro protoplasmático, conferindo motilidade (pela produção de um movimento em “parafuso” que impulsiona o microrganismo) e a forma helicoidal (em contraste com outras bactérias em que é a camada de peptidoglicano que confere a morfologia). A capacidade que estas espiroquetas têm de se deslocar através de meios com elevada viscosidade é fundamental, possibilitando deste modo a sua penetração nos tecidos e a sua disseminação quer no vetor quer no hospedeiro (34, 61).

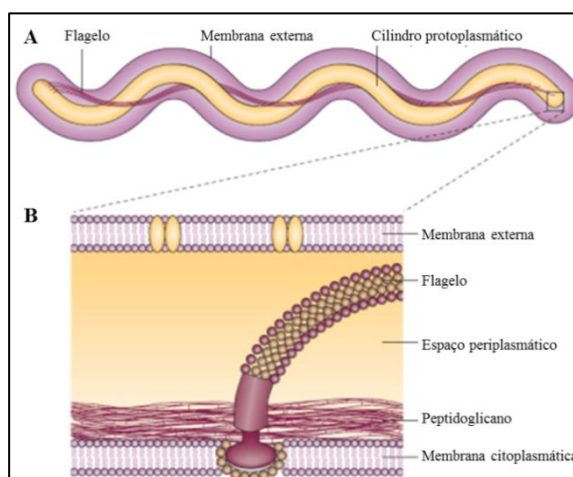


Figura 3: Estrutura e morfologia da bactéria *B.b.s.l.* A) diagrama da bactéria; B) estrutura da bactéria e do flagelo. Adaptado de Rosa e col. (2005) (61).

A primeira sequenciação completa do genoma de *B.b.s.l.* foi obtida em 1997, por Fraser e col., que sequenciaram a estirpe B31 de *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) (24). Recentemente, Casjens e col. (2011), conseguiram realizar a sequenciação completa das duas estirpes Pko e ACA-1 de *B. afzelii* e PBr e Far04 de *B. garinii* (6).

O genoma da estirpe B31 consiste num único cromossoma linear com o tamanho de 910 725 pares de bases (pb) e pelo menos 21 plasmídeos (12 lineares e 9 circulares), que no seu conjunto perfazem mais de 533 000 pb (Figura 4). Enquanto o cromossoma é constituído maioritariamente por genes que codificam funções vitais para a bactéria, e

por isso o seu conteúdo em genes é mais constante, é nos plasmídeos que se localizam a maioria dos genes responsáveis pela patogenicidade, como por exemplo os que codificam as lipoproteínas de superfície tão importantes na interação bactéria/vetor/hospedeiro, apresentando estes maior variabilidade (24, 34, 72).

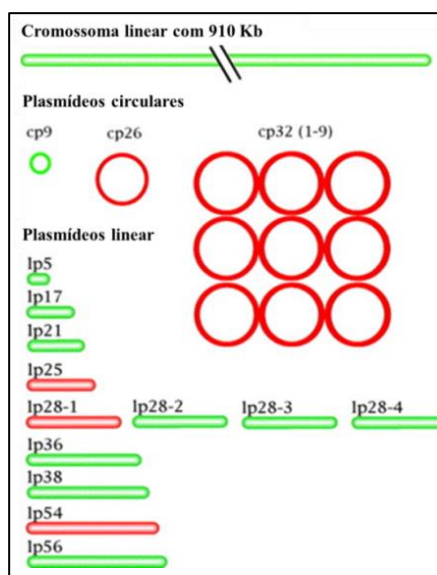


Figura 4: Representação esquemática do genoma das espiroquetas pertencentes ao complexo *B.b.s.l.* (77).

Deste modo, o número e o tamanho dos plasmídeos variam entre as diferentes estirpes e genoespécies, codificando vários fatores necessários à sobrevivência das borrelíias durante o seu ciclo de vida (29, 72).

2.2. TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

As bactérias do complexo *B.b.s.l.* pertencem ao filo Spirochaetes que contém uma única classe, Spirochaetes, e uma única ordem, Spirochaetales. Esta ordem inclui três famílias: Brachyspiraceae, Leptospiraceae e Spirochaetaceae (34).

A família Spirochetaceae inclui o género *Borrelia* e o género *Treponema* (ao qual pertence a espécie *Treponema pallidum*) que causa a sífilis, doença sexualmente transmissível (Figura 5) (29, 34, 84).

O género *Borrelia* inclui atualmente 37 espécies conhecidas, cuja transmissão ocorre pela mordedura de carrças, com exceção de *B. recurrentis* que é transmitida por piolhos. Com base nas diferenças bioecológicas e genéticas, as espécies pertencentes a este género podem ser divididas em duas categorias *major*: espécies causais de Febre Recorrente e espécies responsáveis por BL (1, 50, 67).

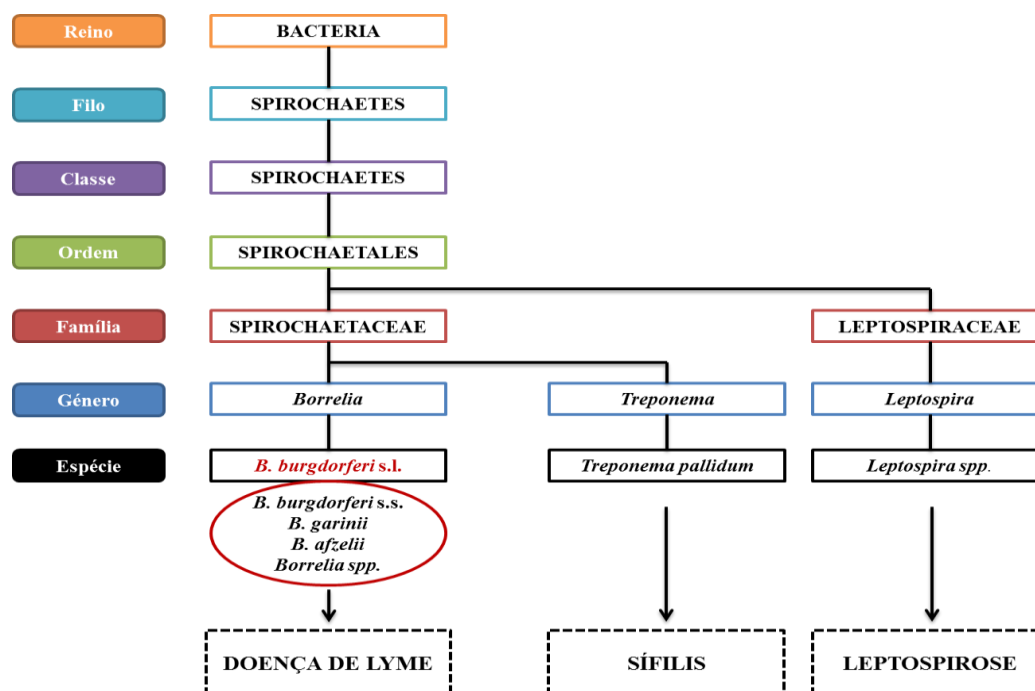


Figura 5: Taxonomia da família Spirochaetaceae (esquema original da autora).

Atualmente o complexo *B.b.s.l.* inclui 19 genoespécies conhecidas, com distribuição mundial (41), mas muitas outras necessitam de ser caracterizadas filogeneticamente (23). De facto, este complexo é constituído por espécies que apresentam uma grande diversidade genética, pelo que se encontram organizadas em grupos genómicos (37). Até ao momento, apenas oito genoespécies pertencentes ao referido complexo são consideradas como verdadeiramente patogénicas para o ser humano: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissetti*, *B. spielmanii* e *B. bavariensis*. Pensa-se, contudo, que outras duas genoespécies, *B. japonica* e *B. kurtenbachii*, possam também ser patogénicas para os humanos, no entanto a sua relevância clínica ainda está por confirmar (23). Estas genoespécies patogénicas podem ser caracterizadas de acordo com o respetivo vetor, distribuição geográfica e organotropismo (75).

As espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* também podem ser divididas em oito serotipos diferentes, sendo este sistema de serotipagem baseado na reatividade entre anticorpos monoclonais e as lipoproteínas de superfície OspA (*outer surface protein A*). Deste modo, o serotipo 1 corresponde a *B. burgdorferi* s.s., o serotipo 2 a *B. afzelii* e os serotipos 3 a 8, a *B. garinii* (75, 80). Um dos serotipos de *B. garinii* (*B. garinii* OspA do serotipo 4) foi considerado em 2009 como um ecótipo distinto dentro do grupo *B.*

garinii, pelo que se admitiu tratar-se de uma nova genoespécie, correspondendo assim à recentemente denominada *B. bavariensis* (60, 73).

Cada genoespécie deste complexo parece estar associada a diferentes manifestações clínicas. Enquanto algumas são responsáveis por formas disseminadas da doença, outras estão associadas a lesões localizadas na pele. Para além disso, cada genoespécie é mantida na natureza em diferentes hospedeiros, e dependendo da região geográfica a sua transmissão está associada a diferentes vetores (80).

2.2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A BL é das doenças cujos agentes são transmitidos por vetores, a mais prevalente no hemisfério norte. Apesar da larga distribuição de casos documentados em todo o mundo, a grande maioria dos mesmos ocorre sobretudo nas regiões temperadas, que apresentam o clima e as condições ideais para a sobrevivência e realização do ciclo de vida das carraças do género *Ixodes*, os vetores preferenciais envolvidos na transmissão de *B.b.s.l.* (80, 82).

Sabe-se que a distribuição geográfica da BL ainda se encontra em expansão (Figura 6), sendo provável que se torne um risco cada vez mais relevante num futuro próximo em termos de Saúde Pública (60). Estima-se que na Europa ocorram cerca de 85 000 casos por ano, e 16 000 - 20 000 casos nos EUA (62).

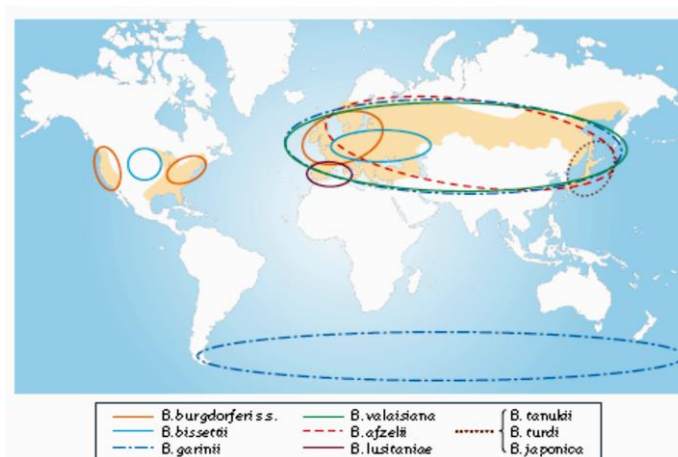


Figura 6: Distribuição geográfica de genoespécies do complexo *B.b.s.l.* (36).

Contudo, na Europa, a BL é uma DDO em apenas alguns países, facto que, associado à subnotificação, e sobretudo ao subdiagnóstico, concorre para que a incidência desta doença se baseie em estimativas aproximadas. No entanto, é evidente

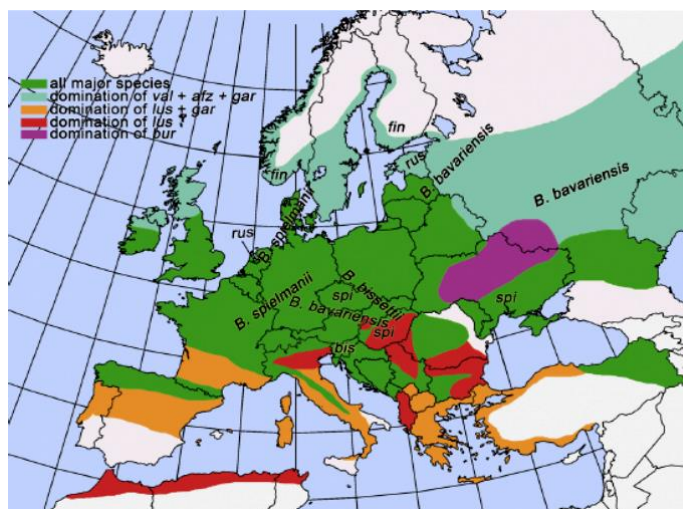
que esta incidência apresenta um gradiente crescente de oeste para este, apresentando os valores mais elevados na Europa Central (74). Face ao exposto, o número total de casos reais no mundo será superior aos valores estimados, rondando os 255 000 por ano (62).

A distribuição geográfica das genoespécies responsáveis pela doença na população humana é variável, sendo a mesma influenciada pela própria distribuição quer do vetor, quer dos hospedeiros (44). Na América do Norte, a única genoespécie com relevância clínica é *B. burgdorferi* s.s., verificando-se os maiores focos endêmicos a nordeste, na costa do Atlântico e Pacífico (80). Estudos recentes têm demonstrado que as genoespécies europeias e a norte americana formam grupos genéticos diferentes e altamente variáveis, o que pode resultar em diferenças no potencial de virulência (23).

Na Europa, onde a BL é endêmica em alguns países (68), várias genoespécies do complexo *B.b.s.l.* podem causar doença, demonstrando as estirpes europeias uma maior diversidade genética do que as americanas. Assim, 11 genoespécies podem ser encontradas na Europa, das quais nove são notoriamente endêmicas: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bissettii* e *B. finlandensis*. Embora a maioria possa ser encontrada em quase todas as regiões, e especialmente na Europa Central, existem determinadas áreas onde se podem encontrar genoespécies com maior patogenicidade para o ser humano (23).

A presença de *B. burgdorferi* s.s. é reportada mais frequentemente a oriente, enquanto *B. afzelii* é mais comum a norte da Europa. *B. valaisiana* está principalmente presente em regiões com temperatura baixa e vegetação rasteira tais como a costa Escandinava, Escócia ou regiões alpinas, enquanto *B. lusitaniae* e *B. garinii* dominam sobretudo na região mediterrânica, a sudeste e ocidente (Figura 7) (23).

Figura 7: Distribuição de *B.b.s.l.* na Europa, Norte de África e parte da Ásia. Espécies *major* incluem: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* e *B. valaisiana* (23).



Outras espécies apresentam uma prevalência inferior e são conhecidos focos em determinados países. Até agora, *B. bissettii* tem sido raramente encontrada em carraças e em amostras humanas originárias da Eslovénia, Polónia, Eslováquia e República Checa. *B. bavariensis*, por seu lado, parece estar limitada principalmente à Europa central, enquanto *B. spielmanii*, outra genoespécie patogénica de rara ocorrência, é ocasionalmente detetada em carraças e amostras humanas em países como a Alemanha, França e Holanda (23, 80).

A recentemente descrita *B. finlandensis*, por Casjens e col. (2011) (5), tem sido encontrada até agora em *I. ricinus* na Finlândia e Noruega (23). Segundo Margos e col. (2010), uma espécie cujo DNA foi descoberto pela primeira vez na Eslovénia em 1997 e estreitamente relacionada com a estirpe americana 25015, foi identificada como uma nova genoespécie, a qual foi designada *B. kurtenbachii* em honra a Klaus Kurtenbach (42), e ocorre de forma endémica na Europa (23). *B. turdi* e *B. carolinensis* foram encontradas apenas uma vez em carraças *I. ricinus*, o que sugere que as aves migratórias podem ter tido um papel importante na distribuição das carraças e das referidas genoespécies, pelo que estas últimas, não ocorrem permanentemente no continente europeu (23).

Segundo Stanek e Reiter (2011), alguns investigadores têm reconhecido que a multiplicidade de genoespécies existentes na Europa pode indicar que as espiroquetas responsáveis pela BL emergiram neste continente. Contudo, outros estudos evidenciaram que existe uma relação mais próxima entre as estirpes europeias do que entre as existentes na América do Norte, o que sugere que, *B.b.s.l.* deverá ter sido introduzida na Europa a partir do continente americano (75).

Na Ásia, a heterogeneidade das estirpes de *B.b.s.l.* é similar à existente na Europa. Até agora, seis genoespécies patogénicas e cinco outras genoespécies com patogenicidade duvidosa têm sido detetadas no continente asiático (23). De acordo com Frank e col. (2013), quase todas as espécies de *Borrelia* europeias podem ser encontradas na Ásia Central e Oriental, contudo, neste continente, *B. lusitaniae* é exclusivamente encontrada em carraças na Ásia Ocidental. Apenas *B. burgdorferi* s.s. parece estar ausente na maioria das regiões asiáticas e tem sido detetada raramente na

Tailândia e sul da China (23). No entanto, *B. garinii* e *B. afzelii* são as principais espécies envolvidas nos casos de BL neste continente (65).

Em 1993, foi descrita a primeira espécie do complexo *B.b.s.l.* exclusivamente distribuída e encontrada no Japão, a qual foi denominada como *B. japonica*. Em 1996, foram descritas duas outras espécies naquele país, *B. tanukii* e *B. turdi* (23).

Existem ainda outras regiões no mundo onde os casos de BL são raramente reportados. Não se sabe, contudo, se a rara ocorrência nestas áreas se deve à ausência de espécies patogénicas ou de vetores, à falta de sensibilização dos clínicos ou à escassez de estudos realizados (23).

No Norte de África, várias espécies de *Borrelia* podem ser encontradas, particularmente nas regiões mais frescas e húmidas da Tunísia, Egipto, Marrocos e Argélia. *B. lusitaniae* é a espécie predominantemente encontrada nestas regiões, embora também *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. e *B. valaisiana* tenham sido ocasionalmente reportadas (23). A análise de isolados de *B. lusitaniae* provenientes do Norte de África tem sugerido que estes constituem um clone de origem Portuguesa (75).

Na Austrália não existem evidências concretas da existência de BL. A bactéria nunca foi isolada a partir de carraças, e a maioria dos casos reportados de doença em humanos basearam-se em testes serológicos. Em 2011, o DNA de espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* foi detetado em oito pacientes australianos através de técnicas de PCR, mas apenas um dos paciente nunca tinha saído do país (23).

Recentemente, na América do Sul, particularmente no Brasil, têm sido reportados casos da chamada Borreliose de Lyme Símile, cujos sintomas são muito semelhantes à BL. Embora se tenha conseguido a visualização de espiroquetas em amostras de doentes, ainda não é claro se elas pertencem ou não ao complexo *B.b.s.l.*. Presentemente estão a ser desenvolvidas tentativas de isolamento destes agentes e deteção do respetivo DNA. Por outro lado, anticorpos específicos para *B.b.s.l.* têm sido detetados em soros de origem humana e animal na Argentina, Colômbia, Bolívia, Peru e Venezuela (23).

3. CARRAÇAS – Vetores de Agentes Patogénicos

As carraças (ou ixodídeos) são artrópodes ectoparasitas hematófagos estritos, que parasitam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados como mamíferos, aves e répteis. São invertebrados pertencentes ao Filo Arthropoda, que engloba também os crustáceos, os insetos, as aranhas, os escorpiões e os ácaros. De facto, as carraças são muito semelhantes aos ácaros, pertencendo ambos à Ordem Acari, embora as carraças tenham maiores dimensões e se alimentem apenas como parasitas (Figura 8) (18, 71).

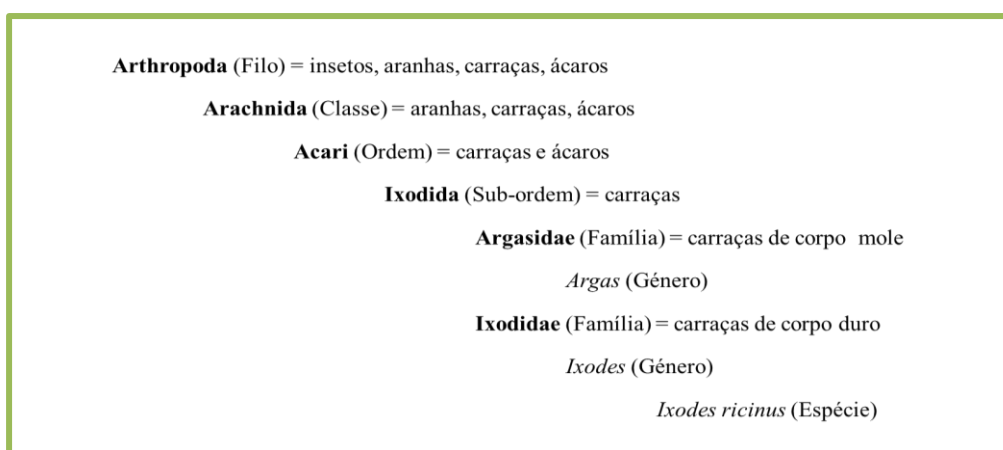


Figura 8: Representação taxonómica, mostrando a relação entre carraças e outros artrópodes (*esquema original da autora*).

De acordo com Silva e col. (2006), conhecem-se cerca de 850 espécies de carraças distribuídas por três famílias: Nuttallielidae, Argasidae e Ixodidae. A espécie *Nuttallielia namaqua* é a única representante da família Nuttallielidae, sendo apenas conhecida na África do Sul (71). A família Argasidae inclui cerca de 170 espécies de carraças, denominadas argasídeos ou “carraças de corpo mole”, devido à ausência de escudo dorsal. Por sua vez, a família Ixodidae é constituída por cerca de 650 espécies de ixodídeos, também designadas “carraças de corpo duro”, uma vez que apresentam escudo dorsal. Apesar de algumas espécies pertencentes à família Argasidae também serem vetores de agentes patogénicos, é a família Ixodidae a que revela maior importância médica pelo número de espécies envolvidas na transmissão de diversos agentes patogénicos aos humanos e a outros vertebrados (71).

O ciclo de vida das carrças compreende quatro estádios: ovo (estádio inativo) e três estádios ativos – larva, ninfa e adulto (Figura 9). Durante cada estágio ativo, as carrças alternam entre períodos de intensa atividade (procura de hospedeiro e alimentação) e períodos não ativos (metamorfose e diapausa) (71).

Figura 9: Estádios ativos de *Ixodidae*: espécimes de *Haemaphysalis punctata*. A e B adultos: A) macho e B) fêmea; C e D imaturos: C) ninfa e D) larva (foto original da autora).



Devido ao seu notável sucesso como potenciais vetores de agentes patogênicos, em associação com características biológicas singulares (Quadro 1), as carrças surgem imediatamente a seguir aos mosquitos como os artrópodes vetores de maior importância em Saúde Pública (71).

Quadro 1: Características biológicas mais importantes das carrças (adaptado de Silva e col. (2006) (71).

CARRÇAS	Hematofagia obrigatória;
	Ciclos de vida mono, di e trifásicos, consoante necessitam de se alimentar em um, dois ou três hospedeiros vertebrados;
	Processo de alimentação geralmente lento, propiciando um longo período de interação com o hospedeiro;
	Todas as fases ativas ingerem grandes volumes de sangue;
	Digestão gradual e intracelular, que ocorre no lúmen intestinal na ausência de enzimas;
	Transmissão transtadial ou transmissão horizontal;
	Transmissão transovárica ou transmissão vertical;
	Apresentam um sistema sensorial desenvolvido ¹ ;
	Diapausa ² ;
	Grande longevidade e elevadas taxas de prolificidade;
	Distribuição mundial, ocupando quase todos os habitats terrestres;
	Reduzido número de predadores naturais.

¹ Sistema sensorial bem desenvolvido que permite detetar a presença de hospedeiros pelas suas emissões de dióxido de carbono, ácido láctico, amoníaco e outros odores, e pelas vibrações que produzem.

² Adaptação que lhes permite a sobrevivência em ambientes desfavoráveis.

As carraças ao transmitirem os agentes patogénicos podem atuar como vetores mecânicos³ ou vetores biológicos. No caso em que a carraça se comporta como vetor biológico, o agente patogénico tem a capacidade de invadir os tecidos do artrópode antes de ser transmitido ao hospedeiro. Esta é a situação mais frequente, verificando-se para a maioria dos agentes associados a carraças (71).

Para que uma carraça transmita eficazmente um agente patogénico é necessário que o artrópode demonstre capacidade vetorial⁴ e competência⁵. Assim, para que um ixodídeo seja considerado um vetor competente de determinado agente é necessário que apresente evidências, não só da sua manutenção, mas também da capacidade de o transmitir a um hospedeiro suscetível (71).

A infeção de uma carraça com um agente patogénico pode ocorrer de várias formas: i) transmissão transtadial e/ou transovárica; ii) alimentação num hospedeiro vertebrado infetado; iii) *cofeeding*⁶. De um modo geral, a transmissão de um agente patogénico ao hospedeiro ocorre quando uma carraça infetada faz a refeição sanguínea, inoculando as suas secreções salivares contendo o agente (71).

As carraças geralmente são zoofílicas, contudo, algumas espécies têm sido encontradas a parasitar os humanos, transmitindo-lhe diversos agente patogénicos. Este facto não se deve a uma tendência antropofílica, mas sim à oportunidade de contacto com o ser humano, que se torna assim um hospedeiro acidental. Em qualquer um dos estádios ativos da carraça pode ocorrer a transmissão do agente patogénico, sendo dada grande importância às fases imaturas (larva e ninfa), que pelas suas reduzidas dimensões, são dificilmente detetadas nos hospedeiros. É sobretudo às ninfas que se atribui a grande maioria das infeções na população humana (71).

³ Vetor mecânico – o agente patogénico não se multiplica dentro do vetor, é transmitido mecanicamente de um hospedeiro para outro. O agente patogénico consegue suportar as condições do trato digestivo da carraça, até que ocorra a transmissão ao hospedeiro vertebrado.

⁴ A capacidade vetorial corresponde à ‘habilidade’ que uma determinada espécie tem, no espaço e no tempo, para transmitir o agente patogénico.

⁵ A competência de um vetor é a capacidade intrínseca que o mesmo tem (ex. carraça) de manter o agente patogénico e de o transmitir biologicamente, durante a refeição sanguínea.

⁶ *Cofeeding* – Processo pelo qual carraças infetadas e não infetadas, se alimentam num determinado hospedeiro e em que a distância que os separa é inferior a um centímetro, o que os obriga a partilhar a mesma área alimentar.

Em Portugal, as condições climáticas, ecológicas e ambientais têm-se revelado favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies de ixodídeos (Quadro 2 e Figura 10).

Quadro 2: Géneros e espécies de *Ixodidae* existentes em Portugal (adaptado de Silva e col., 2006) (64, 71).

Família <i>Ixodidae</i>				
Género				
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Ixodes</i>	<i>Dermacentor</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Haemaphysalis</i>
Espécie				
<i>R. sanguineus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>H. lusitanicum</i>	<i>H. punctata</i>
<i>R. turanicus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. inermis</i>
<i>R. pusilus</i>	<i>I. vespertilionis</i>			<i>H. hispanica</i>
<i>R. bursa</i>	<i>I. ventraloi</i>			
<i>R. annulatus</i>	<i>I. bivari</i>			
	<i>I. canisuga</i>			
	<i>I. simplex</i>			
	<i>I. acuminatus</i>			
	<i>I. frontalis</i>			

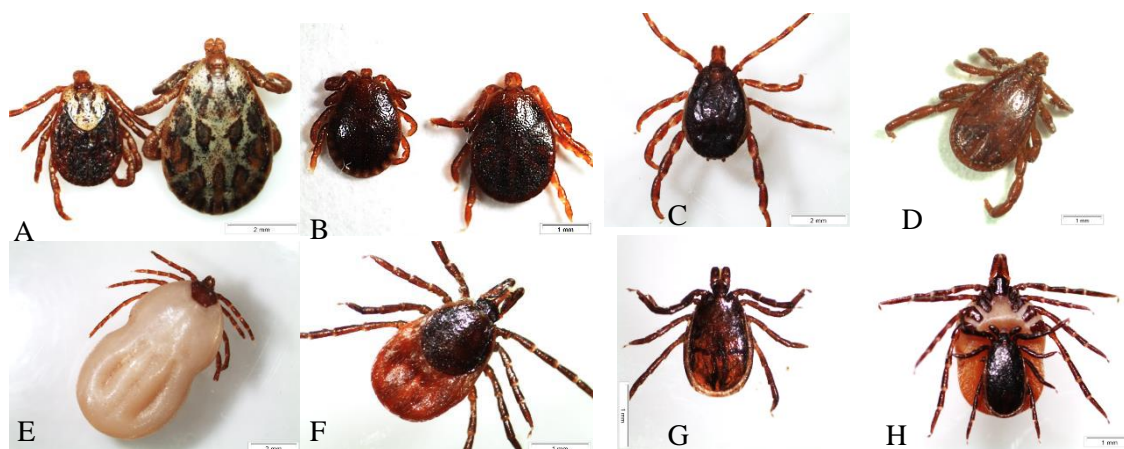


Figura 10: Algumas espécies de carraças de corpo duro existentes em Portugal: A) fêmea e macho *D. marginatus*; B) macho e fêmea *H. inermis*; C) macho *H. lusitanicum*; D) macho *R. sanguineus*; E) fêmea *I. hexagonus*; F) fêmea *I. ricinus*; G) macho *I. ricinus*; H) cópula: fêmea e macho *I. ricinus* (fotos originais da autora).

Apesar das espiroquetas responsáveis pela BL poderem ser detetadas/isoladas a partir de vários géneros de carraças, apenas algumas espécies apresentam um risco considerável de transmissão aos humanos (23, 71). Por este motivo, ao longo deste trabalho será dado ênfase às carraças pertencentes ao género *Ixodes*, que engloba as espécies mais diretamente envolvidas na transmissão de *B.b.s.l.*, sendo portanto, classificadas como vetores competentes e preferenciais destes espiroquetídeos.

3.1. *Ixodes ricinus* – O VETOR DE *B.b.s.l.* NA EUROPA

O complexo de *B.b.s.l.* engloba as espiroquetas patogénicas que requerem obrigatoriamente que o artrópode vetor faça refeições sanguíneas para que ocorra a transmissão e manutenção das referidas bactérias nas populações de hospedeiros vertebrados. Estes espiroquetídeos circulam, assim, na natureza entre os vetores (carraças), que se encontram amplamente distribuídos, e uma grande variedade de animais vertebrados (ciclo enzoótico), tais como pequenos e grandes mamíferos, aves e répteis (48, 80). Contudo, estes mecanismos de manutenção e transmissão de *B.b.s.l.* necessitam de ser clarificados (41).

Apesar das carraças vetores de *B.b.s.l.* pertencerem ao género *Ixodes*, as espécies responsáveis pela transmissão destes espiroquetídeos diferem de região para região (80). Existem quatro espécies de carraças de corpo duro, taxonomicamente relacionadas entre si, que são as principais responsáveis pela transmissão de *B.b.s.l.* aos humanos: *I. scapularis* e *I. pacificus* na América do Norte, *I. persulcatus* na Ásia e no Leste da Europa, e *I. ricinus* na Europa, Norte de África e Ásia Ocidental (Figura 11) (23, 80).

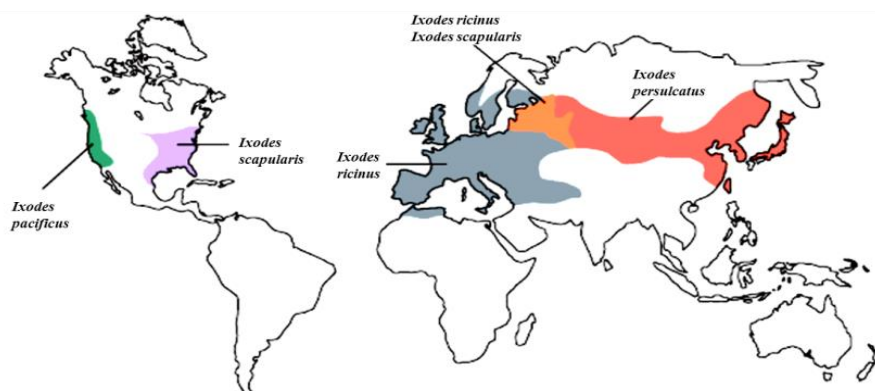


Figura 11: Distribuição mundial das carraças, vetores de agentes da doença de Lyme (23).

A espécie *I. ricinus* (Figura 12) é a que se reveste de maior importância médica na Europa (71) e pode ser encontrada por todo o continente europeu, embora em certas regiões a Este, a espécie *I. persulcatus* seja simpátrica com *I. ricinus* (41).

De acordo com Schwarz e col. (2012), a distribuição e abundância de *I. ricinus* dependem de vários fatores bióticos e abióticos tais como microclima, habitat (vegetação) e dinâmica dos hospedeiros (68). Além disso, o fenómeno do aquecimento global também pode influenciar a distribuição e abundância de *I. ricinus*. A temperatura

elevada favorece a sobrevivência, a atividade e o desenvolvimento das carraças, aumentando consequentemente o risco de transmissão de *B.b.s.l.* (68).

Figura 12: Fêmea de *Ixodes ricinus*, espécie vetor de *B.b.s.l.* na Europa (foto original da autora).



Outras espécies de carraças europeias, como a carraça do ouriço *I. hexagonus*, também podem revelar-se vetores competentes de *Borrelia* spp. No entanto estão raramente ou mesmo nunca envolvidas na transmissão aos humanos, pelo que estas espécies contribuem sobretudo para a circulação das espiroquetas na natureza (41).

Em Portugal, embora exista uma distribuição desigual, as carraças da espécie *I. ricinus* podem ser encontradas de norte a sul, predominando em regiões que apresentam uma considerável cobertura vegetal e onde os níveis de humidade relativa sejam elevados (71). Recentemente tem-se verificado a expansão desta espécie de carraça em termos de altitude e latitude, facto atribuído como consequência das alterações climáticas, resultando na colonização de novos habitats e modificações nos padrões de sazonalidade (64).

3.1.1. CICLO DE VIDA DO VETOR *Ixodes ricinus*

I. ricinus é uma espécie de evolução trifásica, exofílica⁷, e telotrófica⁸. São carraças de três hospedeiros, levando cerca de três anos a completarem o seu ciclo de vida. Alimentam-se durante poucos dias em cada ano: enquanto larva no primeiro ano, ninfa no segundo, e adulto no terceiro. A sua atividade estende-se por todo o ano, embora apresente uma sazonalidade distinta. A atividade das carraças adultas inicia-se no outono (outubro) e termina a meio de março. As larvas e ninfas estão ativas em simultâneo tanto nos hospedeiros assim como na vegetação entre abril e julho (primavera e verão). A duração do ciclo de vida desta espécie é dependente de factores importantes como o clima e a disponibilidade de hospedeiros (18, 27, 45, 48, 71, 76).

⁷ Exofílica – que procura hospedeiro em ambiente aberto; contrário de endofílico – que realiza todo o ciclo de vida no ninho ou abrigo do hospedeiro (também chamado de comportamento nidícola) (18).

⁸ Telotrófica – quando os estádios imaturos se podem alimentar em diferentes hospedeiros, incluindo aqueles nos quais os estádios adultos se alimentam (18).

Estas carrças habitam sobretudo regiões florestadas, onde os níveis de humidade relativa são elevados, passando a maior parte do tempo no solo. De facto, *I. ricinus* é uma espécie dependente do estado higrométrico do ar e da temperatura. Pode ser encontrada em zonas com temperatura e humidade relativa entre os 7°C e 24°C e 45-100%, respetivamente. Em condições desfavoráveis (ausência de vegetação e temperatura elevada) a vitalidade das formas evolutivas pode ficar comprometida, levando-as a procurar refúgios adequados à sua sobrevivência e a recorrer frequentemente, a mecanismos de defesa como a diapausa (48, 68, 71, 76, 80).

Os estádios imaturos (larva e ninfa) mantêm-se sobretudo na vegetação rasteira. As larvas parasitam principalmente pequenos mamíferos, enquanto as ninfas são encontradas em mamíferos de médio porte, aves e répteis (Figura 13). Os ixodídeos adultos são encontrados mais frequentemente em animais de grande porte como os ungulados, e já apresentam dimorfismo sexual. Apenas as fêmeas adultas fazem grandes refeições sanguíneas, enquanto os machos fazem pequenas refeições, ingerindo pouco volume de sangue, e nunca engorgitam. Ambos os sexos podem ser encontrados na vegetação mais alta, enquanto esperam pela passagem dos potenciais hospedeiros. Apenas uma única refeição sanguínea é efetuada em cada estágio evolutivo de *I. ricinus* (Figura 13) (27, 41, 48, 88).

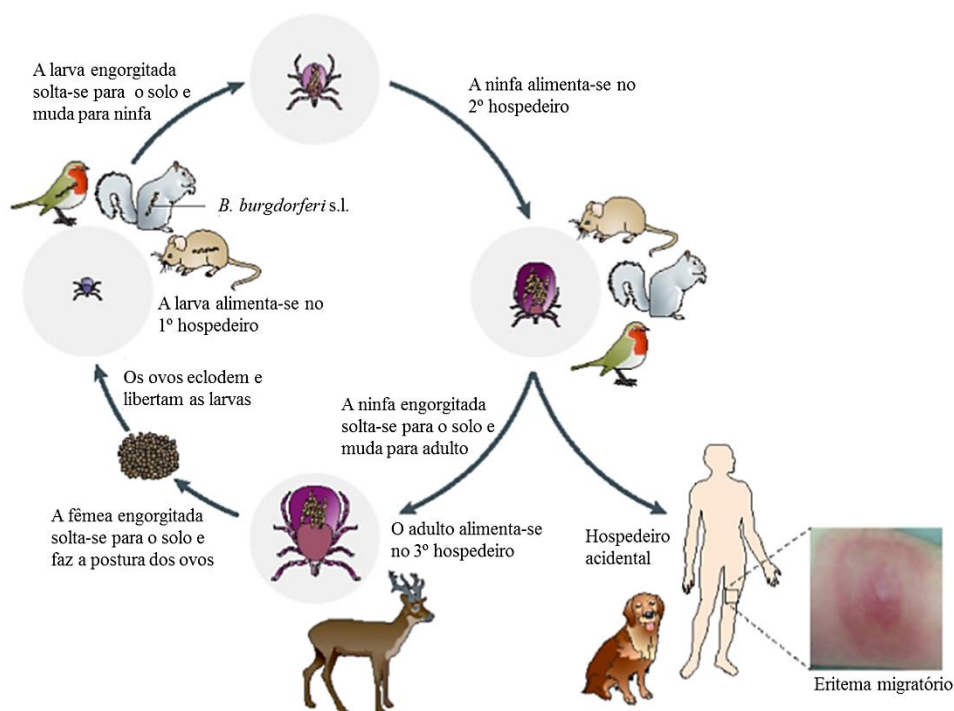


Figura 13: Ciclo de vida da carrça *I. ricinus*. Adaptado de Radolf e col. (2012) (53).

Todos os estádios ativos de *I. ricinus* usam a mesma técnica para conseguirem aderir ao hospedeiro: sobem até ao topo da vegetação onde permanecem em espera. Quando o hospedeiro passa no local, a carraça agarra-se ao corpo do mesmo, fixando-se de seguida à sua pele utilizando as suas peças bucais especializadas. A alimentação das carraças de corpo duro é lenta, permitindo assim que o seu corpo se expanda antes de fazer uma grande refeição sanguínea. Depois de se alimentarem durante alguns dias (cerca de 3-5 dias para as larvas, 4-8 dias para as ninfas e 5-20 dias para as fêmeas adultas), as carraças soltam-se do hospedeiro para o solo. Uma vez no solo, as carraças realizam a muda para o estágio seguinte (de larva para ninfa, ou de ninfa para adulto), processo que leva vários meses a decorrer. O ciclo de vida de *I. ricinus* termina com a cópula e a oviposição. Após o acasalamento, o macho morre, e a fêmea alimenta-se até à total repleção (aumentando o seu volume até 100 vezes), libertando-se de seguida para o solo onde faz uma postura de milhares de ovos (aproximadamente 2000), morrendo em seguida (18, 47, 48, 65, 76).

3.1.2. TRANSMISSÃO E PATOGÉNESE

A transmissão das bactérias do complexo *B.b.s.l.* à carraça pode ocorrer de três formas: *i*) através da refeição sanguínea em hospedeiro infetado (forma mais comum); *ii*) por transmissão transovárica e/ou *iii*) por transmissão transestadial (Figura 14). A percentagem de bactérias transmitidas por via transovárica da fêmea aos ovos é muito baixa, podendo o número de bactérias diminuir ou mesmo desaparecer quando os ovos se desenvolvem em larvas. Por este motivo as larvas parecem não ser vetores importantes de borrelíias (76, 80).

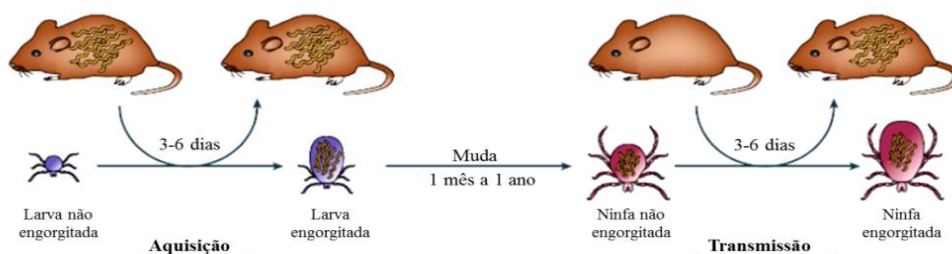
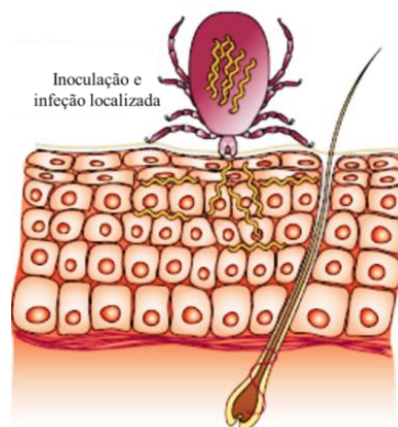


Figura 14: Ciclo natural de infecção por *B.b.s.l.*: aquisição da bactéria e transmissão transestadial. Adaptado de Rosa e col. (2005) (61).

Para que a carraça possa transmitir os espiroquetídeos a um novo hospedeiro é necessário que esta permaneça durante algum tempo ligada ao mesmo. A transmissão ocorre pela injeção da saliva da carraça durante a refeição sanguínea, e é mais eficiente quanto maior for o tempo de fixação desta ao hospedeiro (Figura 15) (80). Mais tarde, as espiroquetas disseminam-se a partir do local da mordedura através do sangue ou outros tecidos, podendo atingir diversos órgãos e sistemas. Neste contexto, vários autores têm verificado que o período temporal de fixação da carraça ao hospedeiro é dependente da genoespécie e do próprio vetor (76).

Figura 15: Representação esquemática da transmissão das espiroquetas ao hospedeiro. Adaptado de Rosa e col. (2005) (61).



Sabe-se, por exemplo, que *B. burgdorferi* s.s. normalmente não é transmitida antes de 48 horas de fixação da carraça ao animal, enquanto *B. afzelii* pode ser transmitida em menos de 24 horas. Também as carraças *I. ricinus* podem transmitir as borrelíias mais rapidamente do que *I. scapularis* e *I. pacificus* (45, 65, 76, 80, 88).

As espécies de *Borrelia* não são transmitidas pelo contacto com fluídos corporais (ex. transfusão) ou pelo ambiente, apesar de ocasionalmente poderem ser detetados em amostras de sangue, urina e leite materno em humanos com eritema migratório (EM), e em leite de origem animal (80).

As borrelíias apresentam várias lipoproteínas de superfície que lhe conferem virulência, variabilidade antigénica, e a capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes (29), e parecem ter a capacidade de interagir com os componentes celular e intersticial dos tecidos da carraça e do hospedeiro animal (34, 72).

Apesar da produção de anticorpos anti-*B.b.s.l.*, as espiroquetas conseguem evadir-se à ação do sistema imunitário do hospedeiro pela habilidade que têm em diminuir a expressão das suas lipoproteínas de superfície, que seriam os principais alvos destes anticorpos. Além disso, a rápida e contínua alteração de estruturas imunogénicas através

de mecanismo de recombinação, induzem a alteração das propriedades antigénicas de algumas proteínas de superfície (variação antigénica), o que leva à evasão imune pela inativação de alguns componentes do sistema imunitário tais como o complemento. A capacidade destas espiroquetas se ligarem a vários componentes da matriz extracelular também poderá contribuir para a persistência da infeção (29, 72, 76).

3.1.3. HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS

A transmissão de *B.b.s.l.* depende de um ciclo zoonótico complexo entre hospedeiros reservatórios e vetores (carraças) (68). O habitat típico e propício à transmissão destes espiroquetídeos é constituído por áreas florestadas, onde se verifique humidade suficiente para suportar o desenvolvimento e sobrevivência das carraças, e pela presença de potenciais hospedeiros/reservatórios (76).

Segundo Schwarz e col. (2012), a espécie *I. ricinus* alimenta-se predominantemente em mais de 300 espécies de vertebrados, infestando pequenos roedores, aves e mamíferos de maior porte (68).

Embora o vetor *I. ricinus* se alimente numa grande variedade de vertebrados, cada espécie de *Borrelia* parece estar associada a determinados hospedeiros. Os humanos e os animais domésticos são considerados hospedeiros acidentais, podendo ser infetados com *B.b.s.l.* quando são mordidos por carraças infetadas. Animais como os cães e os cavalos também podem desenvolver BL tal como os humanos, funcionando os cães como sentinelas da doença (58, 80).

Apesar da vasta gama de vertebrados parasitados por carraças *I. ricinus*, poucos são os hospedeiros que conseguem efetivamente perpetuar as espiroquetas, atuando como seus reservatórios (23).

Diferentes espécies patogénicas de *B.b.s.l.* apresentam predileção por diferentes reservatórios, embora esta especialização possa não ser absoluta (63, 65). De acordo com Vollmer e col. (2013), este facto tem implicações importantes na dispersão e disseminação das diferentes espécies de *Borrelia* (66).

Segundo Radolf e col. (2012), um reservatório de *B.b.s.l.* consiste numa espécie de vertebrados que pode ser persistente e assintomaticamente infetada por estes espiroquetídeos, servindo como fonte de infeção para as carraças que nele se alimentem (53). Dependendo da genoespécie, os reservatórios podem ser mamíferos, aves ou

répteis (Figura 16). *B. afzelii* é perpetuada por roedores, enquanto *B. garinii* e *B. valaisiana* estão associadas principalmente às aves. *B. burgdorferi* s.s. é considerada, segundo Ritcher e col. (2013), uma genoespécie ubíqua, podendo manter-se tanto em roedores como em aves (58). Os roedores também atuam como reservatórios de *B. bissettii* e *B. bavariensis*, enquanto *B. lusitaniae* é mantida sobretudo nos lagartos, tendo as aves um papel *minor* na sua distribuição (58, 68, 80, 82).



Figura 16: Reservatórios de *B.b.s.l.*: roedores, aves e répteis. Adaptado de Mannelli e col. (2011) (41).

De acordo com Richter e col. (2013), o papel dos répteis, tais como os lagartos, na manutenção de *B.b.s.l.* parece variar com a espécie e com a área geográfica (58). A ação do complemento em muitos lagartos é extremamente lítica para estas espiroquetas, e as carraças que fazem a refeição sanguínea nestes vertebrados tornam-se menos propensas a transportá-las, o que se designa por efeito zooprofilático (58). *B. lusitaniae* parece tratar-se de uma exceção, pois é mantida em lagartos, sobretudo na região Mediterrânica. Deste modo, um hospedeiro que seja reservatório para uma dada genoespécie de *Borrelia* pode revelar-se zooprofilático para outra (58, 80).

Na maioria dos habitats de *I. ricinus*, os veados são essenciais para a manutenção da população de carraças, representando uma fonte importante de refeição sanguínea (Figura 17). Apesar destas carraças apresentarem um tropismo especial para estes animais, o veado não é um reservatório competente para as borrelíias, tal como os animais de produção pecuária (76, 80).



Figura 17: O veado e outros cervos representam uma grande fonte de alimentação para a carraça *I. ricinus* (foto original da autora).

Segundo Stanek e col. (2012), a existência de pequenas populações de veados no habitat das carraças pode ser considerada um bom indicador de risco de BL, isto porque outros hospedeiros, incluindo os reservatórios competentes das espiroquetas, podem também estar presentes. Contudo, se a maioria dos animais existentes nesse habitat não forem reservatórios de borrelíias, o risco de BL decresce (efeito de diluição) (76).

Também as aves migratórias revelam um papel importante na distribuição de *B.b.s.l.*, uma vez que para além de serem reservatórios de genoespécies com importância médica, agem como veículo de carraças infetadas, transportando-as e distribuindo-as a longas distâncias (23).

3.2. RISCO E PREVENÇÃO

O risco de BL está especialmente ligado à abundância e exposição às carraças vetores. O elevado risco não está apenas associado à residência em zonas rurais, mas sobretudo com a ocupação profissional. De acordo com Collares-Pereira e col. (2000), indivíduos que desenvolvam trabalhos florestais, agricultores e tratadores de gado, ou que exerçam determinadas atividades de lazer (ex. caça) constituem grupos de elevado risco (7). Devido à abundância e atividade das carraças, o pico de diagnóstico de BL aguda verifica-se sobretudo entre junho e julho, podendo surgir um segundo pico entre o final do verão e início do outono (35, 60).

Existem medidas extremamente importantes que podem ajudar a evitar o contacto com as carraças. Medidas como caminhar pelo centro dos trilhos; evitar ambientes infestados por carraças, e quando tal for inevitável, usar roupas adequadas (com cores claras para fácil observação das carraças, com mangas compridas e calças por dentro das meias ou uso de botas altas), podem contribuir para a diminuição do risco de mordedura por carraças. O uso de repelentes, a observação corporal diária e a remoção imediata das carraças, podem ajudar a prevenir a infeção (45, 76).

A densidade da população de carraças em torno das habitações também pode ser controlada, através do uso de acaricidas ambientais e a construção de cercas que mantenham os veados e outros animais silváticos afastados das zonas de residência. Além disso, a correta desparasitação e vacinação dos animais domésticos, pode ajudar a repelir e a diminuir o tempo de fixação das carraças (35, 76).

4. *B.b.s.l. versus B. DE LYME*

4.1. ASPETOS CLÍNICOS

A BL é uma doença multissistémica complexa, reativa, infecciosa e crónica que atinge vários órgãos e sistemas tais como pele, articulações e sistema músculoesquelético, coração e sistema nervoso (70). Na Europa e na América as principais características clínicas são semelhantes, diferindo em certos aspetos devido à grande diversidade de espécies que causam doença na Europa (74).

Segundo Shamasna e col. (2012), a BL é uma doença que apresenta três fases no decurso da sua evolução (Figura 18), as quais se traduzem geralmente, por manifestações clínicas na pele (eritema migratório (EM), linfocitoma borreliano, acrodermatite crónica atrófica (ACA)), no coração (cardite de Lyme), no sistema nervoso central (neuroborreliose) e nas articulações (artrite de Lyme) (70). Cada espécie patogénica está associada a diferentes manifestações clínicas. A neuroborreliose surge principalmente na Europa (Figura 19), enquanto na América a artrite de Lyme é a manifestação clínica mais frequente. Em ambos os continentes, podem ser observadas formas sintomáticas e assintomáticas da infeção (74, 80).

DOENÇA DE LYME

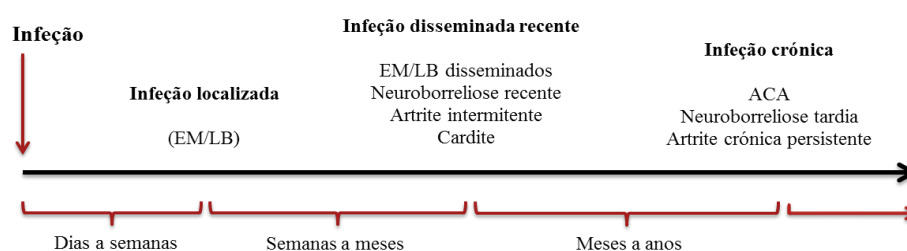
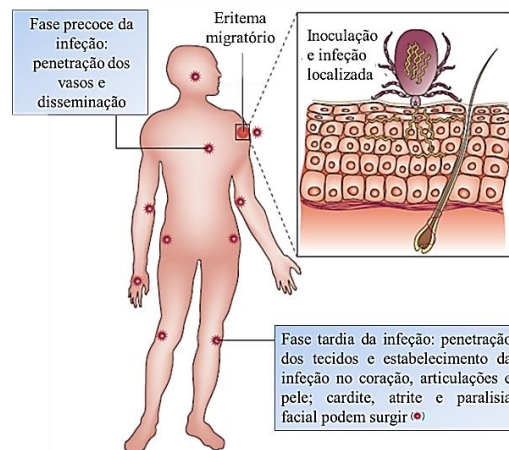


Figura 18: Representação esquemática da evolução da doença de Lyme (*esquema original da autora*).

O EM surge no local da mordedura da carraça (Figura 20A), após um período de sete a 14 dias, predominantemente nos membros inferiores e superiores, e na face. Em alguns casos de BL precoce, o EM pode estar ausente (33, 45, 63, 74, 80). O linfocitoma borreliano (Figura 20B) pode surgir concomitantemente com o EM, é mais comum nas crianças, e ocorre exclusivamente na Europa, estando associado à infeção por *B. afzelii* e *B. garinii* (45, 63, 74, 80).

Figura 19: Representação esquemática do processo de inoculação das espiroquetas na pele e as principais localizações de infecção. Adaptado de Rosa e col. (2005) (61).



A disseminação das espiroquetas por via hematogénica ou linfática pode levar ao desenvolvimento de múltiplos EM, podendo surgir sintomas inespecíficos como febre, artralguas, mialgias, dores de cabeça, leve rigidez da nuca, mal-estar geral, fadiga e linfadenopatias locais (33, 45, 63, 80).

A artrite é associada a *B. burgdorferi* s.s., sendo mais frequente na América. As grandes articulações como joelhos e anca são as mais afetadas (Figura 19 e Figura 20D), podendo levar à destruição progressiva do osso e cartilagem (33, 45, 63, 74, 80).

As manifestações neurológicas estão principalmente associados à infecção por *B. garinii*, sendo a paralisia de Bell (Figura 20C) a manifestação mais frequente. Em alguns casos, as sequelas podem ser irreversíveis (33, 45, 74, 80). A neuroborreliose tardia surge após vários anos de evolução e inclui encefalites multifocais, e doença desmielinizante similar à esclerose múltipla. Mecanismos auto-imunes podem estar na base da neuroborreliose (45, 63, 80). O envolvimento cardíaco e ocular são pouco comuns, e atingem sobretudo os doentes europeus (33, 45, 63, 74, 80).

A ACA é uma doença crónica da pele (Figura 20E), ocorre na Europa e Ásia, estando associada à infecção por *B. afzelii*. As lesões cutâneas são geralmente encontradas nos membros (Figura 19), desenvolve-se num período de vários anos, progredindo para o endurecimento e atrofia da pele. Atinge principalmente as mulheres (45, 63, 74, 80).



Figura 20: Manifestações clínicas da BL: A - eritema migratório; B - linfocitoma borreliano; C – paralisia de Bell; D – artrite de Lyme; e E – acrodermatite crónica atrófica (57, 74, 76, 78).

4.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Embora seja amplamente aceite que o diagnóstico de BL se baseia principalmente nos aspetos clínicos da doença e na avaliação do risco de exposição humana a carraças, na maioria dos casos, a abordagem laboratorial é essencial, devido à natureza inespecífica da maior parte das manifestações clínicas. A possibilidade de que o agente etiológico desta doença possa estar envolvido em outras afeções, torna necessária uma resposta laboratorial inequívoca, que recorra a testes laboratoriais sensíveis e específicos (9, 74).

Os métodos de avaliação laboratorial da BL podem ser diretos ou indiretos. Os mais utilizados são os indiretos, baseando-se na abordagem serológica devido à dificuldade existente nas técnicas de deteção direta (45, 60).

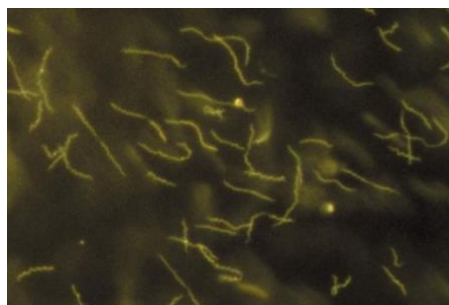
4.2.1. MÉTODOS DIRETOS

Vários métodos permitem a deteção direta de *B.b.s.l.*, tais como a microscopia, a cultura e as técnicas de PCR para amplificação de DNA borreliano (9, 60).

4.2.1.1. MICROSCOPIA

As espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* podem ser detetadas diretamente em amostras biológicas através da microscopia de fundo escuro, de colorações (sobretudo argênticas) e de técnicas de imunohistoquímica. A observação direta das espiroquetas em amostras biológicas, cultura e nos tecidos da carraça é realizada por microscopia de fundo escuro (Figura 21). Na rotina laboratorial, devido à baixa concentração de espiroquetas nas amostras biológicas e às limitações da observação microscópica, estas técnicas de identificação direta são pouco utilizadas (1).

Figura 21: *B.b.s.l.* em cultura: observação por microscopia de fundo escuro (20).



4.2.1.2. CULTURA EM MEIO SELETIVO

O isolamento das borrélias em cultura é a técnica de referência no diagnóstico laboratorial, pois apresenta uma especificidade de 100%. No entanto, a sua sensibilidade é relativamente baixa devido ao baixo número de espiroquetas habitualmente presentes nas amostras biológicas, e devido ao crescimento lento e fastidioso destas bactérias. Contudo, resultados negativos na cultura não excluem infecção ativa. A cultura de *B.b.s.l.* requer um meio de cultura especialmente enriquecido, sendo o meio de Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) ou o meio de Kelly-Pettenkofer modificado (MKP) os mais utilizados. O isolamento destas bactérias geralmente é demorado, podendo levar mais de 12 semanas, mas a maioria das culturas positivam após uma a duas semanas de incubação. Por este motivo, e porque o sucesso da cultura requer não só perícia como também um meio de cultura especializado, esta não é usada como apoio de primeira linha no diagnóstico laboratorial, embora apresente um alto valor diagnóstico (45, 63, 74, 80, 83).

4.2.1.3. AMPLIFICAÇÃO DE DNA BORRELIANO

Atualmente, as técnicas de PCR utilizadas como teste de rotina no diagnóstico da BL têm adquirido uma importância crescente, sobretudo por ser um método mais rápido e sensível do que os métodos bacteriológicos e imunológicos convencionais (9).

As técnicas de PCR permitem a amplificação do DNA genómico de *B.b.s.l.* a partir de amostras de pele, sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido sinovial. Estes testes são de grande utilidade na deteção e identificação de agentes patogénicos de crescimento difícil como *B.b.s.l.*, detetando um baixo número de cópias de DNA. Podem ser utilizados diversos *primers* e genes alvo nos métodos de PCR, porém resultados obtidos por diferentes laboratórios podem apresentar uma variabilidade significativa. Apesar da elevada especificidade da técnica de PCR, a sua sensibilidade é variável. Além disso, a deteção de DNA borreliano pela PCR convencional não permite estabelecer se a infecção se encontra ativa (45, 60, 63, 74, 76, 80).

As técnicas de *nested*-PCR têm sido usadas para aumentar a sensibilidade, pelo recurso a uma segunda amplificação e a dois pares de *primers* específicos. É disso exemplo, a utilização de *primers* desenhados para o espaço intergénico 5S (*rnf*) – 23S

(*rrl*) rRNA (1, 9, 63). De acordo com Baptista (2006), esta abordagem permite a detecção até 10 fg de DNA de *B.b.s.l.*, o que corresponde a aproximadamente duas espiroquetas por amostra (1).

4.2.2 MÉTODOS INDIRETOS

Os métodos para diagnóstico indireto de BL consistem em testes serológicos para a detecção de anticorpos anti-*B.b.s.l.*. São os testes mais frequentemente implementados na rotina laboratorial e incluem a imunofluorescência indireta (IFA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e o *Western blot* (33, 60).

4.2.2.1. SEROLOGIA

Os testes serológicos permitem obter informações muito úteis para o diagnóstico da BL sobretudo em doentes cujos achados clínicos são indicativos de doença tardia. Apresentam como vantagens o facto de usarem amostras de fácil obtenção (soro ou plasma), a sua implementação em laboratório é bastante acessível, e de um modo geral, apresentam uma sensibilidade e especificidade aceitáveis. Porém, os testes que envolvem a pesquisa de anticorpos apresentam algumas limitações: *i*) a resposta por anticorpos na fase precoce da doença pode ser diminuta ou estar mesmo ausente, especialmente nos casos com EM e neuroborreliose; *ii*) pode não existir seroconversão em doentes sujeitos a antibioterapia nas fases iniciais da doença (o que inibe a produção de anticorpos); e *iii*) uma resposta positiva por anticorpos específicos pode persistir por meses ou mesmo anos depois do tratamento da infeção (45, 74, 76).

As atuais recomendações para o serodiagnóstico da BL consistem numa abordagem em duas etapas: um teste inicial de rastreio, que pode ser uma técnica ELISA ou IFA, seguido de um teste confirmatório, o *Western blot*, para confirmação da presença de anticorpos IgG e/ou IgM específicos. Este último teste realiza-se nas amostras com resultados positivos ou inconclusivos no teste de rastreio, permitindo aumentar a especificidade da abordagem serológica (9, 14, 33, 45, 74, 76).

5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE GENOESPÉCIES

Vários métodos baseados na amplificação de DNA borreliano têm sido usados para a identificação das diferentes genoespécies de *B.b.s.l.* a partir de amostras humanas, de cultura, dos reservatórios animais, e das carraças. Nestas últimas, estes métodos têm permitido determinar as taxas de infecção e identificar potenciais áreas de risco em território nacional, e um pouco por toda a Europa (9, 60, 87).

A detecção por PCR de *B.b.s.l.* pode utilizar vários marcadores moleculares. Normalmente utilizam-se genes que codificam lipoproteínas de superfície como *ospA*, *ospB* e *ospC*, e genes que codificam antigénios como *flaB* (que codifica a flagelina, uma proteína presente no flagelo). Outros marcadores moleculares de grande importância são os genes que codificam rRNA de ambas as subunidades ribossomais, especialmente o gene *rrs*, que codifica o 16S rRNA da subunidade menor, e também regiões não codificantes situadas em operações que contém genes para o rRNA (86, 87).

Segundo Wang e col. (1999) a tipificação molecular de genoespécies pode ser conseguida através de vários métodos, tais como a hibridação DNA-DNA, a electroforese em campo pulsado (PFGE), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RLB (*Reverse Line Blot*), sequenciação, entre outros (1, 84).

Uma das técnicas mais utilizadas na genotipagem de *B.b.s.l.* é a PCR-RFLP. Nesta técnica, os amplicões obtidos na PCR sofrem subsequentemente restrição com diferentes enzimas (endonucleases de restrição), verificando-se para cada genoespécie padrões de restrição específicos, que se devem às variações existentes nas sequências dos fragmentos de DNA amplificado. Como vantagem, a técnica de RFLP permite testar simultaneamente um vasto número de amostras e detetar infeções mistas. A RFLP do espaço intergénico 5S (*rrf*) – 23S (*rrl*) rRNA é amplamente utilizado por constituir um simples e rápido método para a genotipagem de *B.b.s.l.*. A existência de padrões de restrição inespecíficos, ou semelhantes entre diferentes genoespécies, pode causar dificuldades na identificação, representando uma desvantagem da RFLP (1, 15, 75, 87).

5.1. PCR EM TEMPO REAL

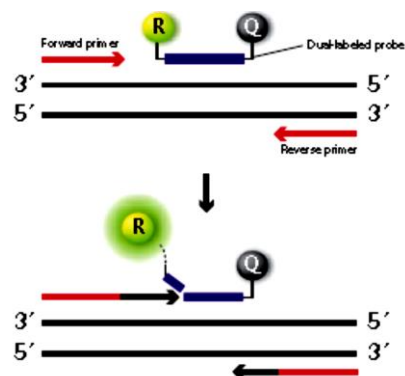
As técnicas de PCR em tempo real (qPCR) têm revolucionado a biologia molecular, apresentando uma vasta gama de aplicações em investigação e no diagnóstico laboratorial, devido à sua robustez, rapidez e sensibilidade (32, 52, 56).

Recentemente a tecnologia de qPCR tem sido implementada para a quantificação e identificação de diferentes genoespécies de *B.b.s.l.*, uma vez que permite reduzir o tempo de análise e aumentar a fiabilidade dos resultados pela redução dos problemas de *carry-over*, pois não requer manipulação pós-PCR. A conceção de uma técnica de qPCR pressupõe a utilização de genes ubíquos nas espiroquetas e que estejam sequenciados, como os genes *recA*, *p66*, *OspA*, *hbb* e *flaB* (21, 32, 52, 55, 85).

Os ensaios de qPCR podem utilizar diversas tecnologias tais como TaqMan[®], SYBR[®] Green ou Lux (*Light Upon eXtension*). De um modo geral, em todas é medida a intensidade de fluorescência emitida durante a extensão da cadeia nucleotídica, que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado (32, 85).

A tecnologia TaqMan[®], utiliza sondas de hidrólise, tirando partido da atividade de exonuclease 5' da enzima DNA polimerase, que hidrolisa a sonda ligada à sequência de DNA alvo durante a extensão da cadeia nucleotídica, resultando na libertação do fluoróforo e consequente emissão de fluorescência (Figura 22) (30).

Figura 22: Representação esquemática da reação de qPCR utilizando sondas TaqMan[®]: a Taq polimerase degrada a sonda durante a extensão da cadeia nucleotídica, libertando-se o fluoróforo e consequente emissão de fluorescência. R – “Reporter”; Q – “Quencher”(30).



A sensibilidade da técnica qPCR a utilizar varia consideravelmente, dependendo de fatores como o gene alvo, o tamanho do amplicão, o método de deteção, e tipo de extracção de DNA usado. Cada ensaio deve ser otimizado para o tipo de amostra e microrganismo a testar. A qPCR também pode ser aplicada nos vetores, quantificando e identificando as espécies de *Borrelia* patogénicas que os infetam, contribuindo desta forma para o controlo ecológico e epidemiológico da BL (1, 31, 32, 66, 85).

II – MATERIAL E MÉTODOS

1. LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

De acordo com o conhecimento prévio da presença do vetor *I. ricinus* em Portugal continental, as áreas de estudo selecionadas para a captura de carraças recaíram em nove distritos: Braga, Vila Real, Aveiro, Guarda, Santarém, Lisboa, Évora, Setúbal e Faro (Figura 23) (1, 64).

As áreas escolhidas permitiram a captura de carraças em zonas representativas da região norte, centro e sul de Portugal continental, na vegetação e em vários hospedeiros animais. No distrito de Lisboa, as capturas foram realizadas principalmente na Tapada Nacional de Mafra (TNM).



Figura 23: Representação (a verde) dos distritos de Portugal continental onde se realizaram as capturas de carraças (imagem original da autora).

1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Portugal é o país mais ocidental da Europa, e o território continental é, do ponto de vista climático, influenciado pelo Atlântico e mar Mediterrâneo (22, 51). A superfície de Portugal continental apresenta cerca de 92 090 Km², dos quais 3,4 milhões de hectares (ha) correspondem a floresta. As áreas florestadas localizam-se predominantemente a norte do rio Tejo, e as áreas agroflorestais e de silvopastorícia a sul (Figura 24) (12, 40).

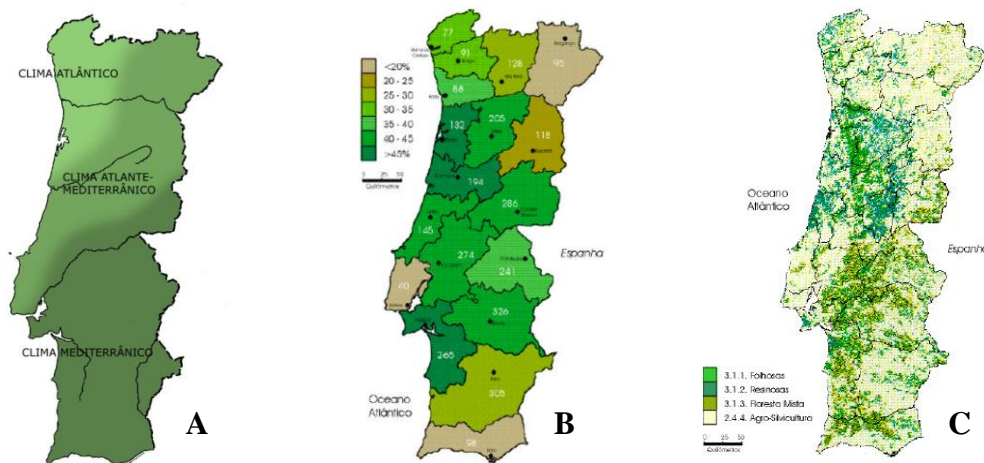


Figura 24: Representação esquemática da influência do Atlântico e do Mediterrâneo no clima, e floresta no território continental. **A)** O clima em Portugal (22); **B)** Taxas de florestação (áreas florestadas de cada distrito); **C)** Distribuição de floresta (12).

Uma das áreas de estudo, a TNM, consiste numa reserva ecológica e recreativa fechada, com cerca de 819 ha, apresentando uma área florestal mista, muito rica em fauna e flora (Figura 25), onde se sabe que o agente etiológico da BL está presente, e onde a existência de populações controladas de veados e gamos contribuem para o sucesso do vetor *I. ricinus* (51, 79).



Figura 25: Fauna e flora característica da TNM (fotos originais da autora).

Nos diferentes distritos, a captura de carraças na vegetação foi realizada em diferentes habitats (Figura 26), dando-se maior ênfase às áreas florestadas, que apresentam os fatores bióticos (hospedeiros) e abióticos (humidade, temperatura, precipitação) favoráveis ao desenvolvimento de *I. ricinus*.

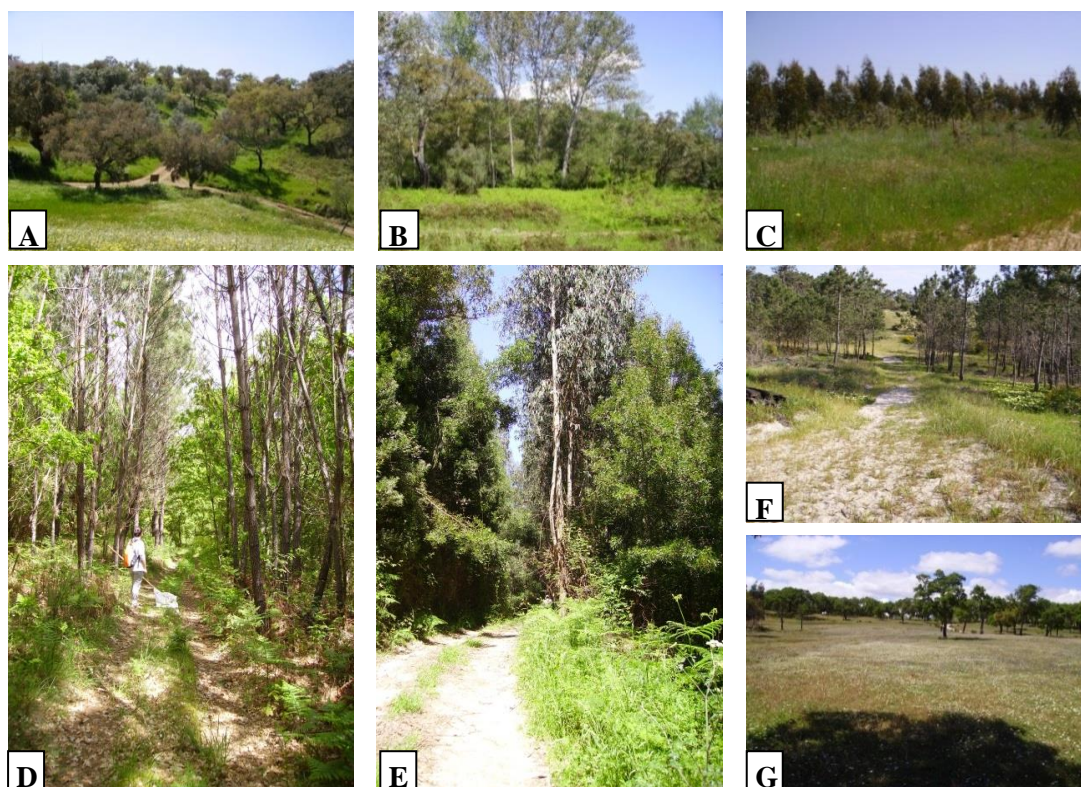


Figura 26: Exemplos de habitats de algumas áreas de estudo: **A** e **B** – Grândola (Setúbal); **C** – Évora; **D** – Parque Natural do Alvão (Vila Real); **E** – Serra de Monchique (Faro); **F** – Dunas de São Jacinto (Aveiro); **G** – Quinta da Torre Bela (Lisboa) (*fotos originais da autora*).

1.2. POPULAÇÃO DE IXODÍDEOS

A amostra de ixodídeos foi constituída por 4487 espécimes obtidos da vegetação e de algumas espécies animais. Neste total, foram também incluídas 904 carraças cedidas gentilmente pela Doutora Carla Maia, pertencente ao Grupo de Leishmanioses (Unidade de Parasitologia Médica) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). As capturas foram realizadas no período de um ano, entre maio de 2012 e junho de 2013.

1.3. ELABORAÇÃO DE FICHA DE CAMPO

Antes de se iniciar a captura de carraças foi preparada propositadamente uma ‘Ficha de Campo’ para o registo de diversos parâmetros relativos ao habitat e/ou hospedeiro, e às condições ambientais (Anexo 1). Em cada dia de capturas, era preenchida uma ficha no que diz respeito ao número da colheita, hora, data, local e o

tipo de captura efetuada (vegetação e/ou hospedeiro), e ainda às variáveis ambientais (temperatura, humidade, precipitação, visibilidade e vento).

Aquando da captura das carraças na vegetação, procedia-se ao registo das variáveis quantitativas: temperatura, humidade relativa, esforço de captura, trajeto percorrido e número de coletores. Registavam-se também as variáveis qualitativas precipitação, visibilidade e vento, que eram classificadas de acordo com a sua intensidade numa escala de “nulo” a “forte”, tipo de vegetação e tipo de habitat.

No caso de colheita de carraças em hospedeiro animal, efetuava-se o registo das variáveis quantitativas que incluíam número de hospedeiros e número de carraças por hospedeiro, e o registo das variáveis qualitativas “tipo de hospedeiro” e “local de remoção”.

1.4. MÉTODOS DE CAPTURA NA VEGETAÇÃO

Para a captura de carraças na vegetação foram utilizadas duas flanelas brancas: uma mais pequena com 1 m², usada na técnica de bandeira (*flagging*) para a vegetação mais alta; e outra maior com 1 m x 1,5 m, utilizada na técnica de arrastamento (*dragging*) para a vegetação rasteira e trilhos (Figura 27) (10, 28, 39, 58).



Figura 27: Captura de carraças na vegetação: **A)** técnica da bandeira (*flagging*); **B)** arrastamento (*dragging*) (fotos originais da autora).

As capturas foram realizadas em diferentes períodos do dia, e durante as mesmas utilizou-se um termohigrómetro (HI 9564 *HANNA instruments*) para a medição da temperatura e humidade relativa (51) no início e no final do procedimento (17).

Após a captura, todas as carraças foram devidamente acondicionadas em tubos de plástico, secos, com tampa de rosca, nos quais foi introduzido um pedaço de vegetação e feitos uns pequenos orifícios na tampa, de modo a permitir a entrada de ar, mantendo

deste modo, as carraças vivas até à chegada ao laboratório do IHMT em Lisboa [Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme (GLBL)] (65). O transporte dos tubos foi feito em malas térmicas à temperatura de 4 - 8°C. Após o acondicionamento dos tubos, procedeu-se à identificação das carraças.

1.5. MÉTODOS DE CAPTURA NO HOSPEDEIRO ANIMAL

A colheita de carraças foi realizada em animais domésticos (cães, gatos, ovinos e bovinos) e em animais silváticos (veados e gamos) (10). Todos os animais estavam vivos no momento da colheita, com exceção dos veados e gamos, cuja colheita de carraças foi efectuada em época de caça na TNM e na Quinta da Torre Bela (QTB) nos concelhos de Mafra e Azambuja, respetivamente, sendo as carraças recolhidas imediatamente após o abate do animal (Figura 28).

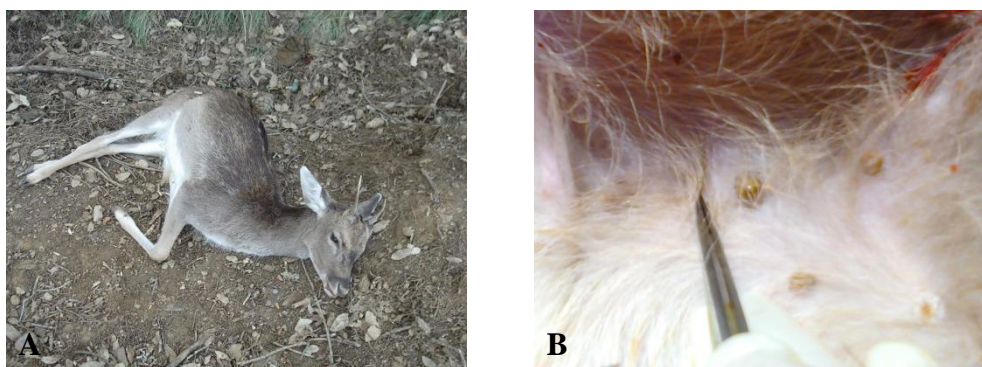


Figura 28: Colheita de carraças no hospedeiro animal: A) Gamo após o abate; B) Carraças engorgitadas e fixas ao hospedeiro (*fotos originais da autora*).

Cada animal foi inspecionado visualmente e por palpação, de modo a detetar a presença de carraças (27). Foi dada especial atenção a algumas localizações da cabeça (orelhas, olhos e pescoço), região anogenital e abdominal. As carraças eram retiradas cuidadosamente da pele do animal utilizando uma pinça, de modo a manter as suas peças bucais intactas. Posteriormente eram acondicionadas em tubos de plástico tal como já descrito anteriormente (*vide* ponto 1.4).

2. ATIVIDADE LABORATORIAL

2.1. IDENTIFICAÇÃO DE CARRAÇAS

No laboratório os ixodídeos foram observados num estereomicroscópio binocular (Motic SMZ-168), para identificação taxonómica (Figura 29), recorrendo-se a chaves dicotómicas em manuais de identificação e informatizadas (26, 51).

As carraças foram primeiramente separadas de acordo com o número da colheita, origem (vegetação ou hospedeiro), espécie, estágio de desenvolvimento e sexo. De seguida foram colocadas em tubos Eppendorf® de 1,5 ml, devidamente numerados, e conservadas a -20°C até à extracção de DNA (87). Paralelamente, foi sempre preenchida uma ficha de identificação de carraças (Anexo 2) previamente elaborada para o efeito, na qual se registaram dados relativos ao número de colheita, ao conteúdo de cada tubo, e ao número de carraças, espécie, estágio, sexo e origem.

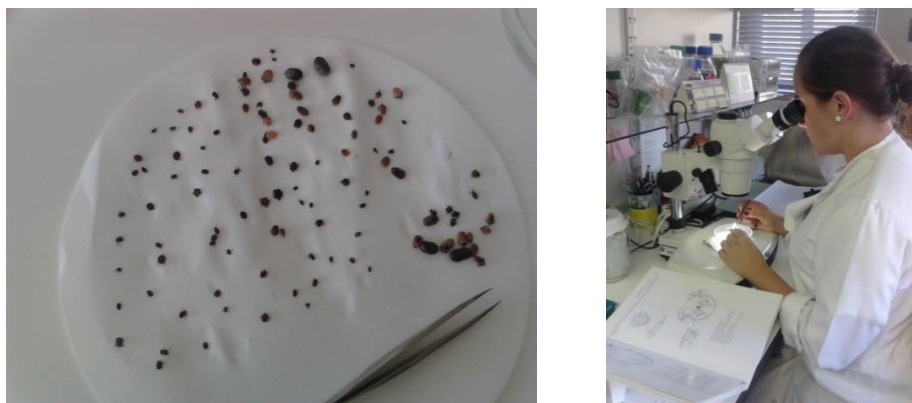


Figura 29: Observação de carraças ao estereomicroscópio e utilização de chaves dicotómicas para identificação da espécie (*fotos originais da autora*).

2.2. MANUTENÇÃO DE ESTIRPES DE REFERÊNCIA DE *B.b.s.l.*

Durante o estudo, foram mantidas em cultura oito estirpes diferentes de *B.b.s.l.* da bateria de referência do laboratório: PGau de *B. afzelii*, PoHL1 e PoTiBL37 de *B. lusitaniae*, B31 e VS219 de *B. burgdorferi* s.s., Pbi de *B. garinii*, Pbi bava de *B. bavariensis* e VS116 de *B. valaisiana*. Estas estirpes foram cultivadas em meio seletivo líquido BSK completo (Sigma®), e colocadas em estufa a 33-34°C (59, 66, 89). Semanalmente o crescimento e a viabilidade das culturas foram sendo controlados pela observação das mesmas em microscópio de fundo escuro. Apesar do meio de cultura

turvar ligeiramente e mudar de cor (de vermelho a amarelado) quando a população bacteriana atinge aproximadamente $1-2 \times 10^6$ bactérias/ml, a existência de contaminação também leva à mudança de cor por alteração do pH do meio. A manutenção das culturas foi garantida pela realização imediata de passagens, assim que se verificasse crescimento bacteriano, de modo a adaptar o isolado ao meio de cultura. Estas passagens foram realizadas em câmara de fluxo laminar e à chama (Bico de Bunsen), de modo a evitar contaminações.

2.3. EXTRAÇÃO DE DNA DE CULTURA E DE AMOSTRAS HUMANAS

Foram ainda incluídas no presente trabalho, seis amostras humanas positivas (três de LCR e três de soro), provenientes da seroteca do GLBL (escolhidas aleatoriamente e analisadas entre 2010 e 2012): duas amostras de soro e uma LCR de doentes do distrito de Lisboa, e duas de LCR e uma de soro de doentes do distrito de Évora. Estas amostras foram analisadas para comparação dos perfis de restrição das diversas genoespécies de *B.b.s.l.* entre as amostras humanas e as dos vetores, por RFLP.

Para a extração de DNA a partir de culturas puras de *B.b.s.l.*, e de amostras biológicas (soro e LCR) de doentes, utilizou-se o kit comercial “Gentra Puregene” da QIAGEN[®]. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, utilizando-se pontas com filtro de modo a reduzir o risco de contaminação. O processo de extração de DNA incluiu a realização de três controlos de extração (CE) utilizando, H₂O Milli-Q, de forma a controlar possíveis contaminações. O DNA extraído tal como os CE foram conservados a -20°C para posterior utilização pelas técnicas de amplificação.

2.4. EXTRAÇÃO DE DNA DE CARRAÇAS

Inicialmente, e quando se encontravam conspurcadas (i.e. com sangue, terra, pêlos), as carraças foram desinfetadas em hipoclorito de sódio diluído e em etanol a 70%, através de lavagens sucessivas em cada uma das soluções durante cinco minutos, sendo por fim passadas três vezes por água destilada (1, 9).

A extração de DNA das carraças foi realizada por hidrólise alcalina, utilizando uma solução de amónia (1, 9, 13, 28, 87). Cada carraça foi colocada num tubo Eppendorf[®] *save-lock* de 1,5 ml contendo solução extemporânea de amónia a 20%, e

macerada manualmente utilizando uma ponta de pipeta esterilizada. As larvas, da mesma espécie, foram maceradas em *pools* de dez espécimes. De seguida, os tubos foram selados e colocados no termobloco a 100°C durante 20 minutos (Figura 30). Posteriormente, as tampas dos tubos foram abertas e o conteúdo dos mesmos, sujeito à ebulição até se atingir metade do volume inicial. Os produtos de extração foram devidamente conservados a -20°C (1, 9, 28).

Figura 30: Extração de DNA de ixodídeos por hidrólise alcalina: ebulição a 100°C durante 20 minutos (*fotos originais da autora*).



A Tabela 1 apresenta os volumes de solução de amónia a 20% utilizados para a extração de DNA das carraças de acordo com o estágio de desenvolvimento, e o respetivo volume final obtido após a ebulição.

Tabela 1: Número de carraças *versus* estágio de desenvolvimento e volume de amónia usado na extração de DNA.

Estadio	Nº carraças por tubo	Amónia a 20% (µl)	Volume final (µl) após ebulição
Larva	10	100	50
Ninfa	1	100	50
Adulto	1	500	250

De forma a controlar a existência de contaminações durante o passo da extração, realizou-se paralelamente a cada série de extrações, três controlos negativos, que consistiram em três tubos Eppendorf® *save-lock* contendo apenas 100 µl de amónia (sem *template*), que eram submetidos a ebulição no termobloco tal como as carraças (1, 13).

2.5. DETECÇÃO DE DNA DE *B.b.s.l.*

2.5.1. *NESTED-PCR*

Todos os *templates* de DNA de ixodídeos, incluindo os controlos negativos de extração foram analisados por *nested-PCR* para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) do rRNA e para o gene *flaB* de *B.b.s.l.*. Para ambas as técnicas, inicialmente o DNA extraído foi testado em *pools* (73) de três carraças para os adultos e ninfas. No caso de uma *pool* ser positiva, então cada DNA presente na mesma era analisado separadamente de modo a identificar qual(ais) a(as) carraça(s) infetadas por *B.b.s.l.* As larvas, por sua vez, foram testadas em *pools* de dez. Este procedimento permitiu não só o ganho de tempo, como também diminuir gastos.

A *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA em uso no laboratório utiliza *primers* específicos (1, 9, 13, 59, 68) (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na *nested-PCR* do espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, posições de homologia e dimensão dos produtos amplificados (1, 6, 10).

Designação do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Posição no espaço intergénico	Dimensão do Amplicão
23SN1 (1ª PCR)	5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC-3'	469-446	380 pb
23SC1 (1ª PCR)	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	92-115	
23SN2 (2ª PCR)	5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA-3'	469-444	230 pb
5SC (2ª PCR)	5'-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3'	243-263	

O operão ribossomal de *B.b.s.l.* apresenta uma organização singular, existindo uma duplicação em “tandem” dos dois genes (26), localizando-se o gene *rrs* (16S) a 200 kb a jusante (Figura 31). Como este tipo de arranjo dos genes ribossomais é único e altamente conservado, a *nested-PCR* do espaço intergénico revela grande especificidade para *B.b.s.l.* (25, 26, 46, 84).

Na primeira amplificação obtém-se um fragmento de DNA inicial com 380 pb, enquanto que na segunda, o fragmento final apresenta cerca de 230 pb (Figura 31).

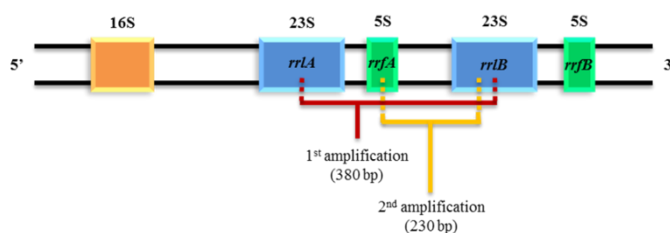


Figura 31: Esquema representativo do espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) do rRNA de *B. burgdorferi* s.l. e amplicões obtidos nos dois passos da técnica de *nested*-PCR (11).

Ambas as amplificações da *nested*-PCR foram realizadas no termociclador MyCycler™ Thermal Cycler BioRad® e as reações de polimerização em cadeia ocorreram em tubos Eppendorf® de 0,2 ml (Sarstedt). Do DNA obtido na primeira amplificação, foram usados 5 µl como *template* na segunda PCR. Em ambas as amplificações o volume final de reação foi de 25 µl (Quadro 3).

Quadro 3: Concentrações, volumes e condições de amplificação usadas na *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA (1).

1ª PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA			
Master mix 1	Concentrações	Volume/tubo	Condições de amplificação
H ₂ O autoclavada	-----	20 µl Mix 1	<u>1 ciclo:</u> Desnaturação inicial – 1 min, 94,5°C
Buffer	1x (Bioline®)	+	<u>25 ciclos:</u>
MgCl ₂	2,5 mM (Bioline®)	5 µl template	Desnaturação – 30 s, 94°C
dNTP's	0,8 mM (Bioline®)	=	Emparelhamento – 30 s, 52°C
Primer 1 (23SN1)	0,2 µM	25 µl	Extensão – 1 min, 72°C
Primer 2 (23SC1)	0,2 µM	(Volume final)	<u>1ciclo:</u>
Taq polimerase	0,6 U/µl (Bioline®)		Extensão final – 5 min, 72°C
2ª PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA			
Master mix 2	Concentrações	Volume/tubo	Condições de amplificação
H ₂ O autoclavada	-----	20 µl Mix 2	<u>1 ciclo:</u> Desnaturação inicial – 1 min, 94,5°C
Buffer	1x (Bioline®)	+	<u>40 ciclos:</u>
MgCl ₂	2,5 mM (Bioline®)	5 µl template 1ª PCR	Desnaturação – 30 s, 94°C
dNTP's	0,8 mM (Bioline®)	=	Emparelhamento – 30 s, 55°C
Primer 3 (23SN2)	0,2 µM	25 µl	Extensão – 1 min, 72°C
Primer 4 (5SC)	0,2 µM	(Volume final)	<u>1ciclo:</u>
Taq polimerase	0,6 U/µl (Bioline®)		Extensão final – 5 min, 72°C

Também por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA efetuou-se a amplificação do DNA das oito estirpes de referência mantidas em cultura, assim como a amplificação do DNA das seis amostras biológicas humanas (soro e LCR) positivas para *B.b.s.l.*, sendo posteriormente analisadas por RFLP.

A *nested*-PCR *flaB* foi realizada com os mesmos *templates* de DNA de ixodídeos analisados na *nested*-PCR anteriormente descrita, sendo este teste específico para o género *Borrelia*. As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na *nested*-PCR *flaB* (11, 86).

Designação do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Dimensão do Amplificação
Fla1 (132f) - 1ª PCR	5'-TGGTATGGGAGTTTCTGG-3'	774 pb
Fla2 (905r) - 1ª PCR	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	
Fla3 (220f) - 2ª PCR	5'-CAGACAACAGAGGGAAAT-3'	604 pb
Fla4 (823r) - 2ª PCR	5'-TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC-3'	

Ambas as amplificações da *nested*-PCR *flaB* ocorreram em tubos Eppendorf® de 0,2 ml (Sarsted), e no termociclador MyCycler™ Thermal Cycler BioRad®. O volume final de reação foi de 25 µl em ambas as amplificações. Contudo, na primeira PCR foram usados 2,5 µl de *template*, e na segunda foi utilizado 1 µl de *template* da primeira PCR (Quadro 4).

Quadro 4: Concentrações, volumes e condições de amplificação usados na *nested*-PCR para o gene *flaB*.

1ª PCR <i>flaB</i>			
Master mix 1	Concentrações	Volume/tubo	Condições de amplificação
H ₂ O autoclavada	-----	22,5 µl Mix 1	<u>1 ciclo:</u> Desnaturação inicial – 10 min, 94°C
Buffer	1x (Bioline®)	+	<u>40 ciclos:</u>
MgCl ₂	1,5 mM (Bioline®)	2,5 µl template	Desnaturação – 30 s, 94°C
dNTP's	1 mM (Bioline®)	=	Emparelhamento – 45 s, 50°C
Primer Fla1	1 µM	25 µl	Extensão – 1 min, 72°C
Primer Fla2	1 µM	(Volume final)	<u>1 ciclo:</u>
Taq polimerase	1U/µl (Bioline®)		Extensão final – 7 min, 72°C
2ª PCR <i>flaB</i>			
Master mix 2	Concentrações	Volume/tubo	Condições de amplificação
H ₂ O autoclavada	-----	24 µl Mix 2	<u>1 ciclo:</u> Desnaturação inicial – 10 min, 94°C
Buffer	1x (Bioline®)	+	<u>40 ciclos:</u>
MgCl ₂	1,5 mM (Bioline®)	1 µl template 1ª PCR	Desnaturação – 30 s, 94°C
dNTP's	1 mM (Bioline®)	=	Emparelhamento – 45 s, 54°C
Primer Fla3	1 µM	25 µl	Extensão – 1 min, 72°C
Primer Fla4	1 µM	(Volume final)	<u>1 ciclo:</u>
Taq polimerase	1U/µl (Bioline®)		Extensão final – 7 min, 72°C

Durante os procedimentos de *nested*-PCR, adotaram-se várias medidas para o controlo de possíveis contaminações: a preparação das *master mix* e a adição do *template* à mistura de reação foram realizadas em câmaras de fluxo laminar e em espaços físicos diferentes; as pipetagens dos reagentes foram efetuadas com pontas com filtro; incluiu-se sempre um controlo positivo (CP) recorrendo-se a DNA de cultura pura de *B. garinii* (Pbi); foram também incluídos controlos negativos em cada etapa de amplificação (CN1 e CN2, sendo CN1 também submetido à segunda PCR), usando-se água destilada como *template*, de modo a excluir resultados falsos positivos (73).

Os produtos de amplificação das duas *nested*-PCR foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose (Bioline®) a 1,5%, durante 35 minutos a 125 volts (13, 54, 73, 85, 90), utilizando-se RedSafe™ *Nucleic Acid Staining Solution* como alternativa ao brometo de etídio (EtBr). O Red Safe tem a vantagem de ser tão sensível como o EtBr, e a sua manipulação é mais segura pois não é tóxico, mutagénico ou cancerígeno (16). O marcador de DNA utilizado foi o “HyperLadder IV (100-1000 pb)” (Bioline®). Apenas se analisaram por eletroforese os produtos da segunda PCR, pois esta última etapa da *nested*-PCR permite potenciar a quantidade de produto amplificado.

Cada gel de eletroforese foi observado sob luz ultravioleta (UV) no equipamento “Dolphin-Doc Plus Gel Image system” (Wealtec®). A presença de uma banda com 230 pb na *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, e de uma banda com 604 pb na *nested*-PCR *flaB* foram sempre confirmadas pelos respetivos CP. A observação das referidas bandas nas amostras de carraças, revelou a presença de DNA de *B.b.s.l.*. Todos os produtos de PCR foram mantidos a -20°C para estudos posteriores.

2.5.1.1. SENSIBILIDADE DA *NESTED*-PCR

Para determinar a sensibilidade das duas abordagens de *nested*-PCR, realizaram-se diluições sucessivas de duas culturas puras com a concentração de 10⁸ bactérias/ml, das estirpes B31 de *B. burgdorferi* s.s. e Pbi de *B. garinii*, procedendo-se de seguida à extracção de DNA com o kit comercial anteriormente referido. As diluições seriadas da estirpe B31 foram analisadas por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, enquanto as diluições seriadas da estirpe Pbi foram processadas por *nested*-PCR *flaB*. A densidade das culturas foi determinada por espetofotometria (SmartSpec Plus, BioRad®).

2.5.1.2. GENOTIPAGEM POR RFLP

De forma a identificar as genoespécies de *B.b.s.l.* presentes nos ixodídeos e nas amostras humanas, todos os produtos de DNA amplificados pela *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA foram posteriormente submetidas à técnica de RFLP com a enzima de restrição *MseI* (8, 13, 26, 90). Uma vez que cada genoespécie apresenta um padrão de restrição específico, isso permite a respetiva distinção e identificação.

Inicialmente os produtos positivos na *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e os produtos de amplificação das estirpes de referência, foram submetidos a uma segunda amplificação com os *primers* “3” e “4” de modo a potenciar a concentração de DNA amplificado (13). De seguida, 10 µl de cada produto da PCR (DNA borreliano), foram digeridos durante duas horas a 37°C numa solução com 1,25U da endonuclease *MseI*, 500 µg de BSA e buffer 10x, para um volume final de 25 µl (1).

Os padrões de restrição obtidos por RFLP foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida [Mini gel (10 x 8 x 0,75 cm)]. O gel de poliacrilamida é constituído por duas fases: o gel de concentração (contendo 5% de acrilamida-bisacrilamida) onde as amostras são concentradas, e o gel de resolução (com 16% de acrilamida-bisacrilamida), no qual as amostras são separadas (Quadro 5) (38). O gel de concentração fica na parte superior do suporte, sendo as amostras posteriormente separadas no gel de resolução com base na velocidade de migração de acordo com a dimensão dos fragmentos de DNA.

Quadro 5: Reagentes utilizados na preparação do gel de poliacrilamida (volumes e respetiva função) (1).

Reagentes	Gel de resolução 16% (n=2)	Gel de concentração 5%
H ₂ O Milli-Q	9,9 ml	3,8 ml
Acrilamida-Bisacrilamida 40% (19:1) (Biorad®)	8 ml	650 µl
TBE 10x	2 ml	500 µl
APS 10% (Biorad®)	150 µl	40 µl
TEMED (Biorad®)	17 µl	12 µl
Função dos reagentes utilizados		
Acrilamida-Bisacrilamida	“Cross-linker” na polimerização	
APS (<i>Ammonium Persulfate</i>)	Peróxido catalisador (a reação de polimerização da acrilamida é catalisada pela presença de radicais livres)	
TEMED	Iniciador da reação de polimerização	

O gel de resolução foi pipetado para o suporte, adicionando-se posteriormente isopropanol a 100% para garantir a uniformidade da polimerização, que decorreu durante duas horas. Sobre este, foi adicionado o gel de concentração, depois do que se aplicou o pente, permanecendo o gel a polimerizar aproximadamente uma hora. Após a polimerização, retirou-se o pente, e o gel foi colocado numa tina de eletroforese vertical Mini-Protean II Cell (Biorad®) à qual se adicionou tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1x (4°C). Cada poço do gel foi carregado com 13 µl [(10 µl do produto de restrição e 3 µl de *loading buffer* (Biorad®)], e usou-se o marcador de DNA *HyperLadder* 25–500 pb (Bioline®). A eletroforese realizou-se a 100 volts durante 130 minutos (1).

Após a corrida, o gel foi corado com EtBr (12,5 µl em 250 ml de TBE 1x) durante 45 minutos, e posteriormente visualizado sob luz UV no equipamento “Dolphin-Doc Plus Gel Image system” (Wealtec®). Os padrões de restrição obtidos foram comparados posteriormente com os padrões de restrição de cada estirpe de referência (Quadro 6).

Quadro 6: Fragmentos de restrição das estirpes de referência utilizadas, obtidos por digestão dos produtos de *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA com a enzima *MseI* (1, 8, 43, 84).

Estirpes	Origem	País	Dimensão dos fragmentos de restrição obtidos com <i>MseI</i> (pb)
<i>B. afzelii</i> PGau	Humana (pele)	Alemanha	108, 68, 50, 20
<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31 VS219	<i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i>	EUA Suíça	108, 51, 38, 29, 28 105, 55, 41, 33
<i>B. lusitaniae</i> PoTiBL37 PoHL1	<i>I. ricinus</i> Humana (pele)	Portugal Portugal	108, 81, 39, 29 108, 81, 39, 29
<i>B. garinii</i> Pbi	Humana (LCR)	Alemanha	108, 57, 50, 38
<i>B. bavariensis</i> Pbi bava	Desconhecida	Alemanha	108, 95, 50
<i>B. valaisiana</i> VS116	<i>I. ricinus</i>	Suíça	175, 50, 23, 7

2.5.1.3. SEQUENCIAÇÃO

Alguns dos produtos obtidos pela *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e testados por RFLP, foram enviados para sequenciação na empresa StabVida (Portugal) (32), para identificação das genoespécies. As sequências obtidas foram comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) com as sequências depositadas no GenBank para as diferentes genoespécies de *B.b.s.l.* (73). Os resultados da sequenciação foram posteriormente comparados com os resultados obtidos por RFLP.

2.5.2. PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Durante a realização deste trabalho, iniciou-se otimização de uma técnica de qPCR, utilizando a tecnologia TaqMan® (nova abordagem para o material em estudo), para detecção, identificação e quantificação de *B.b.s.l.*, e tendo como alvo o gene *flaB*. A implementação desta qPCR ainda se encontra em desenvolvimento, e tem como intuito ser aplicada a amostras humanas e carraças. Para tal, foram desenhados quatro ensaios de qPCR, como demonstrado no Quadro 7.

Quadro 7: Ensaios de qPCR, genes alvo e objetivo de cada ensaio.

qPCR	Gene alvo	Objetivo
Género	<i>flaB</i>	Deteção e quantificação de <i>B. burgdorferi</i> s.l.;
Genoespécies	<i>flaB</i>	Deteção, identificação e quantificação de <i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. afzelii</i> , <i>B. lusitaniae</i> e <i>B. garini</i> ;
β - actina	β - actina mamíferos	Controlo interno para amostras de mamíferos;
18S	18S carraças	Controlo interno para amostras de carraças de corpo duro.

Nesta fase inicial procedeu-se ao desenho de *primers* e sondas, à otimização das condições de amplificação, e determinação da sensibilidade e especificidade da técnica.

Para o desenho de *primers* e sondas, várias sequências foram identificadas por BLAST: para a ‘qPCR género’ identificaram-se várias sequências do gene *flaB* de *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bissettii* e de *B. miyamotoi*; e para a ‘qPCR genoespécies’ pesquisaram-se sequências do gene *flaB* para as quatro principais genoespécies patogénicas encontradas na Europa: *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae*, *B. garinii* e *B. afzelii*. De seguida, realizou-se o alinhamento das sequências no programa informático “BioEdit”, e posteriormente desenharam-se os respetivos *primers* e sondas para cada um dos ensaios. O programa “Oligoanalyser” permitiu avaliar se os *primers* e sondas desenhados cumpriam todos os requisitos necessários. Posições de variação levaram ao desenho e utilização de *primers* e sondas degenerados, que foram posteriormente sintetizados pela MWG® (Alemanha).

Foram também desenhados *primers* e sondas (MWG®) para os genes 18S de carraças e β -actina de mamíferos, que foram usados como controlo interno, de modo a garantir a eficiência da extração de DNA, quer de carraças quer de produtos biológicos humanos, assim como a existência de amplificação durante a qPCR (3).

Prevê-se que esta nova técnica envolva o desenvolvimento de uma qPCR multiplex inicial que funcione como rastreio, e uma segunda qPCR multiplex para distinção e identificação das genoespécies do complexo *B.b.s.l.* presentes em amostras humanas e nos vetores (carraças) (Figura 32).

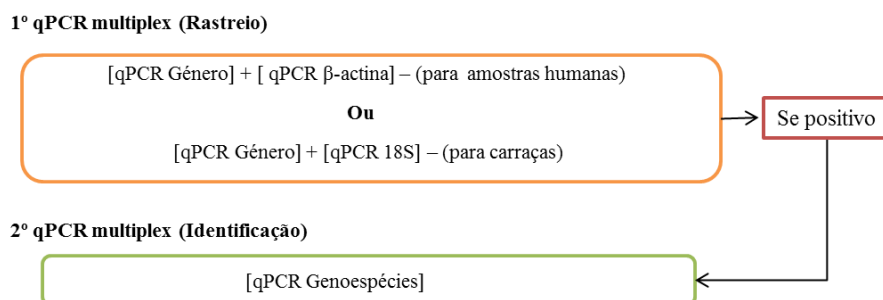


Figura 32: Protocolo laboratorial para detecção e identificação de *B.b.s.l.* em amostras humanas e no vetor pela técnica de qPCR (esquema original da autora).

O protocolo utilizado para as diferentes abordagens encontra-se descrito no Quadro 8, e segue as indicações padrão da bula Rotor-Gene® Multiplex Handbook (QIAGEN®). Todas as amostras testadas por qPCR foram processadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research®) (2).

Quadro 8: Condições para o desenvolvimento da técnica de RT-PCR.

qPCR			
Mix RT-PCR	Concentrações	Volume/tubo	Condições de amplificação
<i>Master mix</i> ⁹ <i>Primer forward</i> <i>Primer reverse</i> <i>Sonda TaqMan</i> <i>H₂O RNase-free</i>	1x (QIAGEN®) 0,5 µM (MWG©) 0,5 µM (MWG©) 0,2 µM (MWG©) --- (QIAGEN®)	18 µl Mix + 2 µl DNA = 20 µl (volume final)	<u>1 ciclo:</u> Desnaturação inicial – 5 min, 95°C <u>45 ciclos:</u> Desnaturação – 15 s, 95°C Emparelhamento – 15 s, 60°C <u>1ciclo:</u> Extensão final – 5 min, 72°C

Inicialmente avaliou-se o funcionamento dos *primers* e sondas desenhados para os controlos internos 'qPCR β-actina' e 'qPCR 18S'. Para a qPCR β-actina testaram-se em duplicado dois soros positivos para *B.b.s.l.*, dois soros positivos para *Leptospira* spp., duas amostras de LCR e duas amostras de urina. Para a qPCR 18S testaram-se, em duplicado, os três estádios de desenvolvimento das carraças (larva, ninfa e adulto) das espécies *H. punctata*, *I. ricinus* e *R. sanguineus*, e ainda um exemplar das espécies *D.*

⁹Composição da *Master mix*: Taq polimerase, *Buffer*, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

marginatus, *I. hexagonus*, *Hy. lusitanicum*, *Hy. marginatum* e *H. inermis*. Foram incluídos controlos negativos (mix qPCR e H₂O Milli-Q) em todas as qPCR realizadas.

As sequências dos *primers* e sondas desenhados para os controlos internos encontram-se descritas no Quadro 9, e as sequências dos *primers* e sondas para os ensaios ‘qPCR género’ e ‘qPCR genoespécies’ estão descritas no Quadro 10.

Quadro 9: Sequências nucleotídicas dos *primers* e sondas desenhados e utilizados como controlo interno da qPCR.

qPCR β -actina			
Designação	Sequência	Tm	Fluoróforo
Sonda	5' – TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC – 3'	65,2°C	FAM
Primer foward	5' – GGCTCY <u>ATY</u> CTGGCCTC – 3' ¹⁰	59,6°C	-----
Primer reverse	5' – GCA <u>Y</u> TTGCGGTGS <u>ACR</u> ATG – 3' ¹¹	59,5°C	-----
qPCR 18S			
Designação	Sequência	Tm (°C)	Fluoróforo
Sonda	5' – ATCTTGGTCTAATAAAAGCACCCG – 3'	61,8	FAM
Primer foward	5' – AGCTAATACATGCAGTGAGC – 3'	56,4	-----
Primer reverse	5' – CTCGTGGCCATGCGATCA – 3'	58,4	-----

Quadro 10: Sequências nucleotídicas dos *primers* e sondas desenhados para os ensaios qPCR Género e qPCR Genoespécies.

qPCR Género			
Designação	Sequência	Tm (°C)	Fluoróforo
Sonda	5' – TTGGAAAGCACCTAAATTTGCTCTT – 3'	58	JOE
Primer foward	5' – TTAATGTTACAAC <u>Y</u> ACAGTTGA – 3' ¹²	51	-----
Primer reverse	5' – ACCTCATCTGTCATTGTAGC – 3'	55	-----
qPCR Genoespécies			
Designação	Sequência	Tm (°C)	Fluoróforo
Primer foward	5' – CAAGATGAAGC <u>D</u> ATTGCTGTAAA – 3' ¹³	57,5 - 59,3	-----
Primer reverse	5' – TGAG <u>W</u> AGG <u>Y</u> GCTGTAGCAG – 3' ¹⁴	57,3 - 59,5	-----
Sondas:			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	5' – TCCTTCCTGTTGAACACCCTCTTG – 3'	65,2	FAM
<i>B. lusitaniae</i>	5' – TTGAACACCTTCTTGAGCAGGTGCA – 3'	65,8	JOE
<i>B. afzelii</i>	5' – TTCTTGAGCACCTCTTGAACAGG – 3'	65,2	ROX
<i>B. garinii</i>	5' – CTTGTTGAGCTCCTTCTTGAACAGG – 3'	65,8	Cy5

¹⁰ Y = C/T.

¹¹ R = G/A; S = G/C; Y = C/T.

¹² Y = C/T.

¹³ D = T/A/G.

¹⁴ W = A/T.

2.5.2.1. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA qPCR

Foi determinada a sensibilidade dos ensaios de ‘qPCR género’ e ‘qPCR genoespécies’, utilizando-se diluições seriadas de DNA (85). Para o ensaio ‘qPCR género’ utilizou-se uma cultura pura da estirpe PGau de *B. afzelii*, enquanto que para o ensaio ‘qPCR genoespécies’, usaram-se culturas puras de *B. burgdorferi* s.s. (B31), *B. afzelii* (PGau), *B. lusitaniae* (PoHL1) e *B. garinii* (Pbi), procedendo-se à extração de DNA e posterior realização de diluições seriadas, de 10^7 a 1 bactéria/reação (de modo a determinar o limite de deteção e a eficiência dos ensaios). A partir dos resultados obtidos para a sensibilidade das várias qPCR, aferiu-se a curva padrão para cada ensaio.

A especificidade da qPCR foi determinada utilizando-se DNA de várias espécies de microrganismos, nomeadamente *Leptospira* spp e *Treponema pallidum* (bactérias), e *Plasmodium* spp e *Leishmania* spp (protozoários).

2.6. CONSENTIMENTO INFORMADO

Os doentes cujas amostras biológicas foram utilizadas neste estudo, foram previamente informados e todos tiveram pleno conhecimento do âmbito do mesmo, e da finalidade do processamento das suas amostras, pelo que consentiram de livre vontade a utilização das mesmas (Anexo 3). De referir que a este nível, os doentes envolvidos já participavam num outro estudo paralelo, em curso no GLBL, o qual foi em tempo útil devidamente autorizado pela comissão de ética do IHMT.

3. ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS

3.1. AMOSTRAGEM

Da população das 4487 carraças capturadas, para este estudo utilizou-se uma amostra de 1716 espécimes de carraças, que foi sujeita à extração de DNA e à análise molecular por *nested*-PCR. As carraças foram selecionadas de forma aleatória, dando-se maior ênfase às carraças da espécie *I. ricinus*, por serem os principais vetores de *B.b.s.l.*, e às carraças do cão, *R. sanguineus*, uma vez que os cães são considerados sentinelas da doença. Na análise molecular, cada *pool* de dez larvas foi considerada como se de uma única amostra se trata-se, pelo que foram analisadas 1608 amostras de ixodídeos.

3.2. BASES DE DADOS

Em ficheiro Microsoft Excel® (2010) foram criadas duas bases de dados: uma relativa ao “trabalho de campo”, onde foram sendo registados todos os dados relativos ao habitat e/ou hospedeiros e condições ambientais, de acordo com os registos efetuados nas fichas de campo; e uma base relativa ao “trabalho laboratorial”, onde se registaram os resultados obtidos na identificação de ixodídeos, e na análise molecular.

3.3. TRATAMENTO DE DADOS

Para a apresentação dos resultados foram elaborados gráficos, quadros e tabelas. Foi avaliada a concordância entre os resultados obtidos nas diferentes abordagens de *nested*-PCR utilizando o teste estatístico “kappa” (k), de acordo com Thursfield (1990) (81), conforme descrito no Quadro 11. Neste teste evidencia-se a concordância existente entre dois testes distintos, na ausência de um teste padrão, sendo que um valor de k igual ou superior a 0,81 é indicador da existência de uma concordância robusta entre os testes (46).

Quadro 11: Cálculo do teste “kappa” (k), de acordo com Thursfield (1990) (81).

		Teste de referência	
		Positivo	Negativo
Teste em estudo	Positivo	a	b
	Negativo	c	d

a – verdadeiros positivos; b – falsos positivos; c – falsos negativos; d – verdadeiros negativos.

$$k = (a + d - P) / (1 - P), \text{ em que } P = (a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)$$

Usou-se ainda o teste de Qui-quadrado (χ^2) para comparar variáveis qualitativas, adotando-se o nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$). Para o cálculo dos testes acima referidos recorreu-se ao programa informático “Primer of Biostatistic, version 3.02” da “McGraw-Hill®”.

III - RESULTADOS

1. POPULAÇÃO DE IXODÍDEOS

Neste estudo capturou-se um total de 4487 carraças (N_C) em nove distritos de Portugal continental (Braga, Vila Real, Aveiro, Guarda, Santarém, Lisboa, Évora, Setúbal e Faro) entre maio de 2012 e junho de 2013, cuja distribuição está representada na Figura 33.

Das 4487 carraças capturadas, 1977 (44,1%) foram recolhidas na TNM, uma vez que esta área se situa relativamente próxima do laboratório, o que facilitou as deslocações e capturas, mas também devido à reconhecida presença do vetor *I. ricinus* neste local.

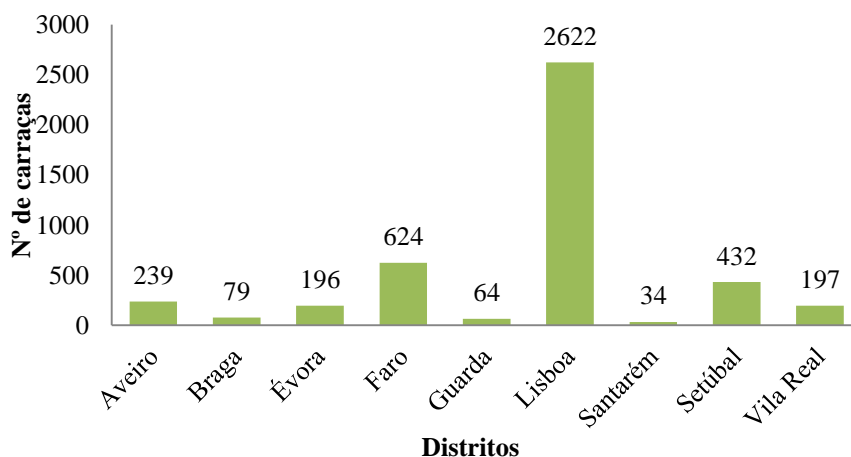
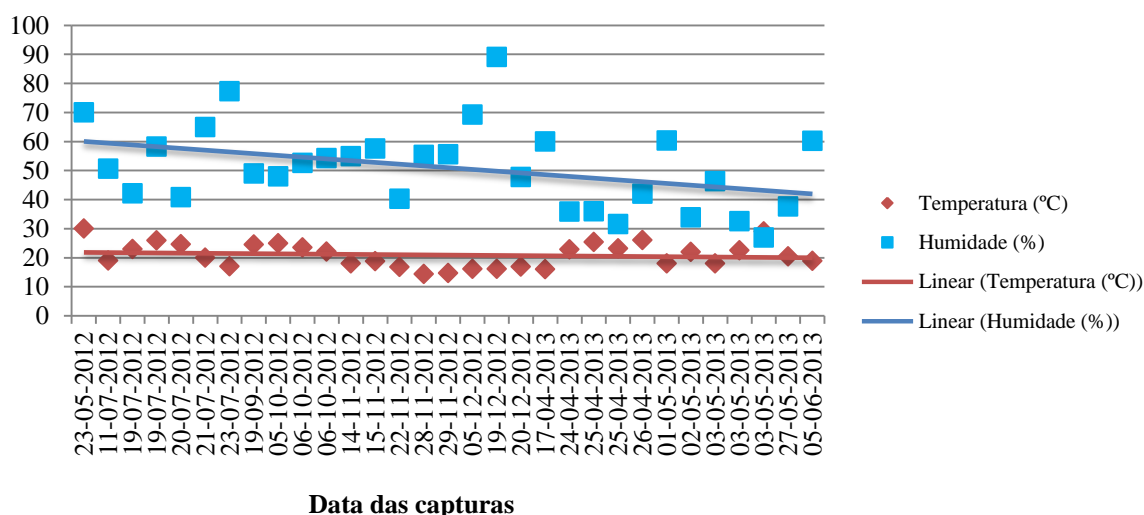


Figura 33: Representação gráfica da distribuição do total de carraças ($N_C = 4487$) capturadas em cada um dos distritos selecionados (maio de 2012 - junho de 2013).

1.1. CAPTURAS NA VEGETAÇÃO

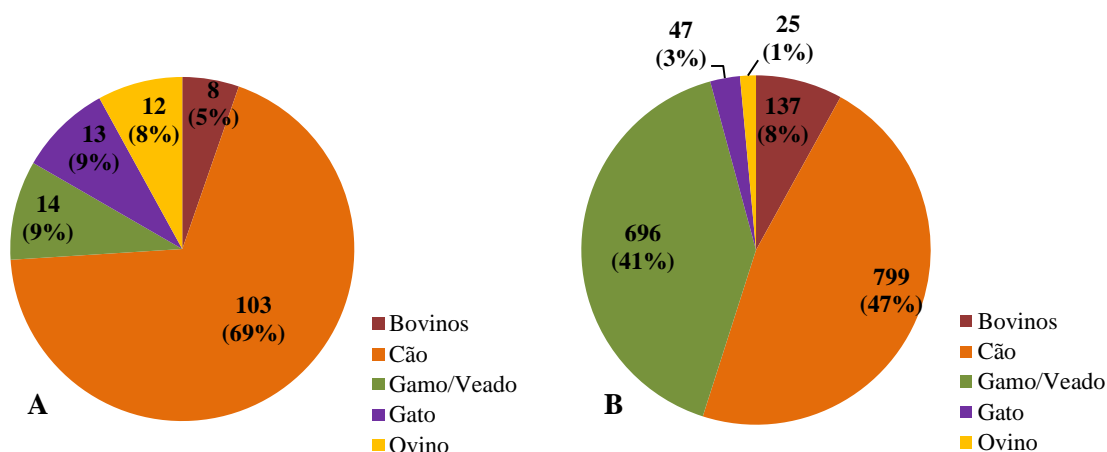
Na vegetação foram capturadas 2783 carraças em oito dos nove distritos prospectados, sendo que no distrito da Guarda as capturas apenas incidiram nos hospedeiros (cães, gatos e ovinos).

No decurso das capturas, os registos da temperatura do ar atmosférico e da humidade relativa, mostraram respetivamente valores médios de 21,7°C [14,4°C (min) e 35°C (máx)] e 51,6% [27% (min) e 89,1% (máx)] (Figura 34). O esforço de captura teve uma duração média de 100 minutos (30' – 300'), com um percurso médio diário de 1085 metros, variando entre 100 e 4000 metros.



1.2. CAPTURAS NO HOSPEDEIRO ANIMAL

Nos hospedeiros animais foram recolhidas 1704 carraças. As carraças foram obtidas num total de 150 hospedeiros (N_H): 136 animais domésticos (103 cães, 13 gatos, 12 ovinos e 8 bovinos) e em 14 animais silváticos (13 gamos e 1 veado). A Figura 35 mostra a distribuição de hospedeiros e das carraças capturadas nos mesmos.



2. ATIVIDADE LABORATORIAL

2.1. IDENTIFICAÇÃO DE CARRAÇAS

As carraças capturadas ($N_C = 4487$) foram identificadas taxonomicamente quanto ao género e espécie. Destas, 357 recolhidas em cães foram apenas identificadas até ao género. A Figura 36 mostra a distribuição das carraças por género taxonómico, enquanto a Figura 37 apresenta a distribuição das carraças por espécie.

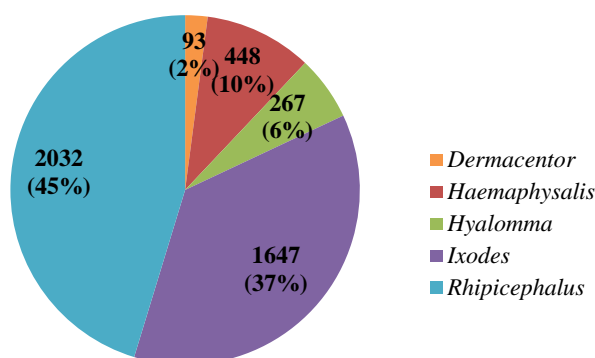


Figura 36: Representação gráfica da distribuição das carraças capturadas ($N_C = 4487$) por género taxonómico.

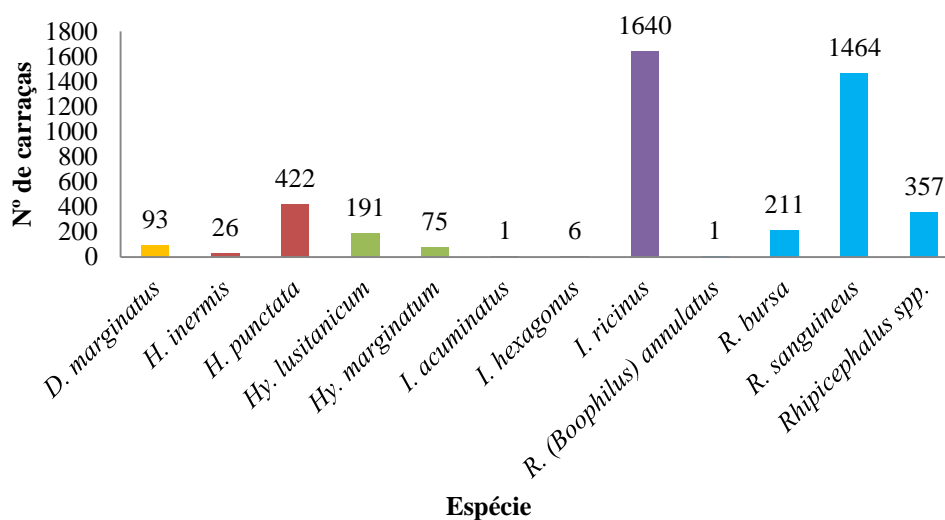


Figura 37: Representação gráfica da distribuição das carraças ($N_C = 4487$) por espécie (a cor usada nas barras do gráfico está de acordo com as da figura 33, referente aos géneros).

Também se determinou a distribuição dos diferentes estádios de desenvolvimento das carraças e o sexo (macho ou fêmea) mais prevalente (Figura 38).

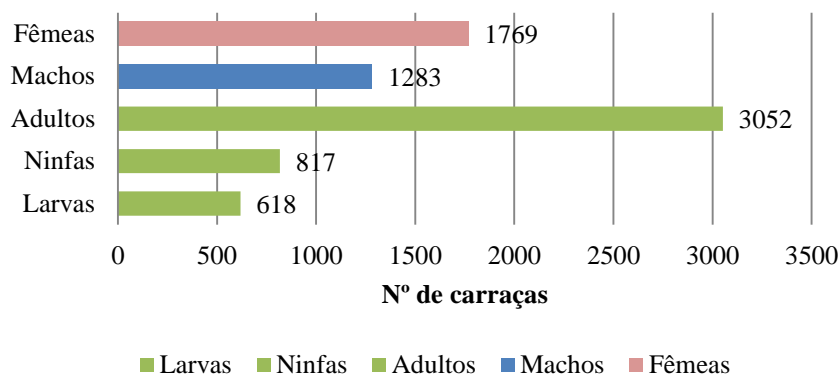


Figura 38: Representação gráfica da distribuição das carraças ($N_C = 4487$) por estádios de desenvolvimento: larvas, ninfas, e adultos (machos e fêmeas).

No Quadro 12 são descritas as diferentes espécies de ixodídeos capturadas em cada um dos nove distritos de Portugal continental, entre maio de 2012 e junho de 2013.

Quadro 12: Espécies de ixodídeos capturadas em cada um dos nove distritos de Portugal continental.

Distrito	Espécies de carraças capturadas
Aveiro	<i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Braga	<i>D. marginatus</i> , <i>H. punctata</i> , <i>I. acuminatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Évora	<i>R. bursa</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Faro/Algarve	<i>D. marginatus</i> , <i>H. punctata</i> , <i>Hy. lusitanicum</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Guarda	<i>Rhipicephalus</i> spp.
Lisboa	<i>Boophilus annulatus</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>H. inermis</i> , <i>H. punctata</i> , <i>Hy. lusitanicum</i> , <i>Hy. marginatum</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Santarém	<i>Hy. lusitanicum</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Setúbal	<i>D. marginatus</i> , <i>H. punctata</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> .
Vila Real	<i>D. marginatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. sanguineus</i> .

Relativamente à presença de carraças em hospedeiros, estas foram recolhidas de seis espécies de mamíferos: cães, gatos, bovinos, ovinos, gamos e veados. Deste modo, identificaram-se as espécies de ixodídeos capturadas em cada um dos diferentes hospedeiros (Quadro 13).

Quadro 13: Espécies de ixodídeos recolhidas nos hospedeiros animais.

Hospedeiro	Espécies de ixodídeos
Cão	<i>I. hexagonus</i> e <i>R. sanguineus</i> .
Gato	<i>I. ricinus</i> e <i>R. sanguineus</i> .
Bovino	<i>R. bursa</i> .
Ovino	<i>Hy. lusitanicum</i> e <i>R. sanguineus</i> .
Gamo/veado	<i>D. marginatus</i> , <i>H. punctata</i> , <i>Hy. lusitanicum</i> , <i>Hy. marginatum</i> , <i>I. ricinus</i> e <i>R. sanguineus</i> .

Considerando que a espécie *I. ricinus* é o principal vetor das espiroquetas pertencentes ao complexo *B.b.s.l.* na Europa, e em Portugal, analisou-se especificamente esta espécie quanto à distribuição dos principais estádios de desenvolvimento de acordo com as estações do ano (Figura 39). Do total de *I. ricinus* capturados ($N_{I_r}=1640$), 1503 espécimes foram provenientes da TNM.

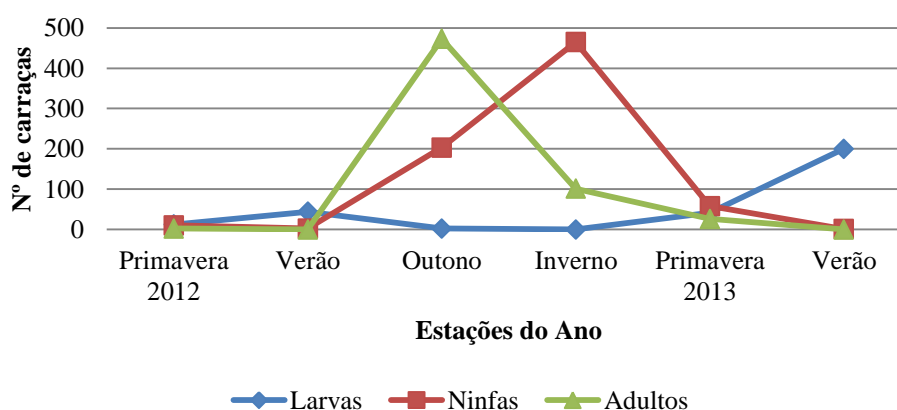


Figura 39: Representação gráfica da distribuição dos diferentes estádios de desenvolvimento de *I. ricinus* ($N_{I_r} = 1640$) de acordo com as estações do ano.

Por outro lado, procurou-se perceber se existe uma associação entre as variáveis qualitativas “vento” e “visibilidade”, e a variável qualitativa “estádio de desenvolvimento” de *I. ricinus* capturado. Para tal, recorreu-se a uma amostra de carracas desta espécie capturadas na TNM e apenas na vegetação ($n= 571$). Para a associação entre as variáveis “vento” e “estádio de desenvolvimento” obteve-se um valor de $p < 0,001$ ($\chi^2 = 41,800$; 4 graus de liberdade) para um nível de significância de 0,05; para a associação “visibilidade” e “estádio de desenvolvimento”, o valor de χ^2 foi igual a 7,416 (2 graus de liberdade), com $p=0,025$ para o mesmo nível de significância. Para a variável “precipitação”, todas as capturas de carracas na vegetação foram realizadas em dias com precipitação “nula”.

Foi também determinado o estágio de desenvolvimento de *I. ricinus* mais prevalente (Figura 40A), e a proporção de machos em relação às fêmeas (Figura 40B).

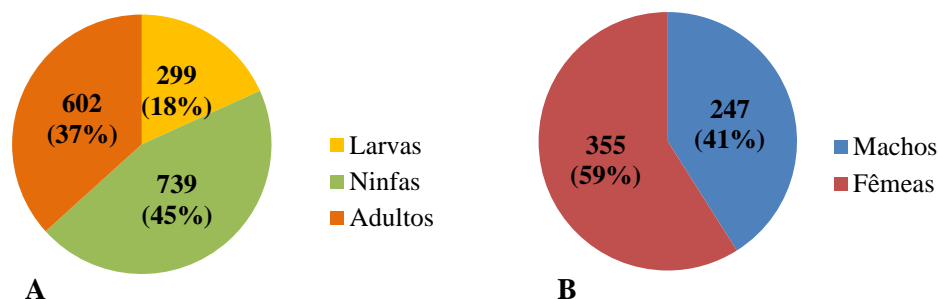


Figura 40: Representação gráfica da espécie *I. ricinus* ($N_r = 1640$) de acordo com os diferentes estádios de desenvolvimento (A), e por sexo (B).

De facto, as ninfas foram o estágio de desenvolvimento de *I. ricinus* mais prevalente (45% dos espécimes capturados), enquanto no estágio adulto, as fêmeas apresentaram uma maior prevalência em relação aos machos (59% ♀ *versus* 41% ♂).

2.2. DETEÇÃO DE DNA DE *B.b.s.l.*

2.2.1. SENSIBILIDADE DA *NESTED-PCR*

Na determinação da sensibilidade da *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e da *nested-PCR* *flaB* obtiveram-se, por observação do gel de eletroforese, os limites de detecção de 10^2 e 10 bactérias/ml, respetivamente (Figura 41).

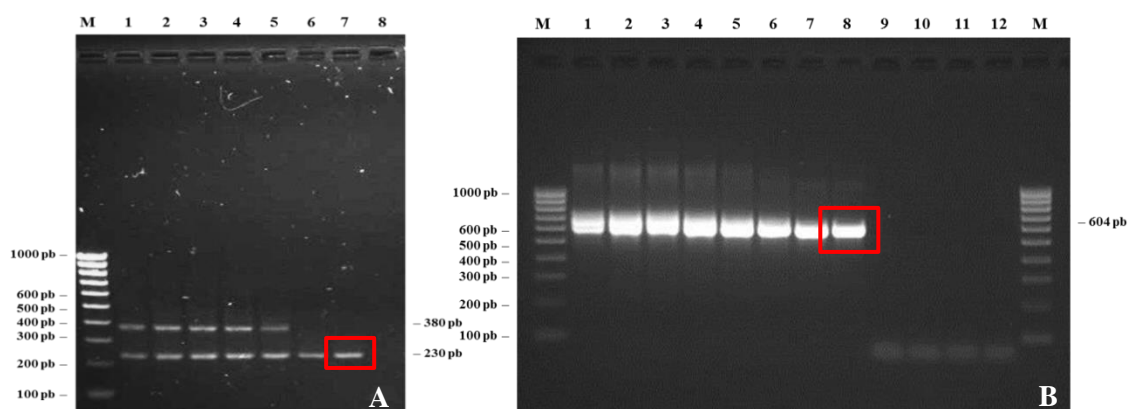


Figura 41: Determinação da sensibilidade das duas técnicas de *nested-PCR* utilizadas. **A)** *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA: M – marcador DNA 100 - 1000 pb; 1 a 8 - diluições seriadas a partir de cultura da estirpe B31 de *B. burgdorferi* s.s. – amplicões de 380 e 230 pb; poço 7 demonstra o limite de detecção de 10^2 bactérias/ml. **B)** *nested-PCR* *flaB*: M – marcador DNA 100 - 1000 pb; 1 a 12 - diluições seriadas a partir da cultura da estirpe Pbi de *B. garinii* – amplicação com 604 pb; poço 8 revela como limite de detecção 10^1 bactérias/ml.

2.2.1.1. ANÁLISE DE CARRAÇAS POR *NESTED-PCR*

Foram analisadas por *nested-PCR* 1608 amostras de ixodídeos. Destas, 704 foram analisadas por *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e *flaB*, e 904 (898 da espécie *R. sanguineus* e seis da espécie *I. ricinus*) apenas foram testadas por *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA para detecção de DNA de *B.b.s.l.*.

Da análise das amostras ixodídeológicas, observou-se que 75% das carraças analisadas pelas duas abordagens de *nested-PCR* pertenciam à espécie *I. ricinus* (Figura 42). Na Tabela 4 encontram-se discriminadas as espécies de carraças e o número de exemplares testados.

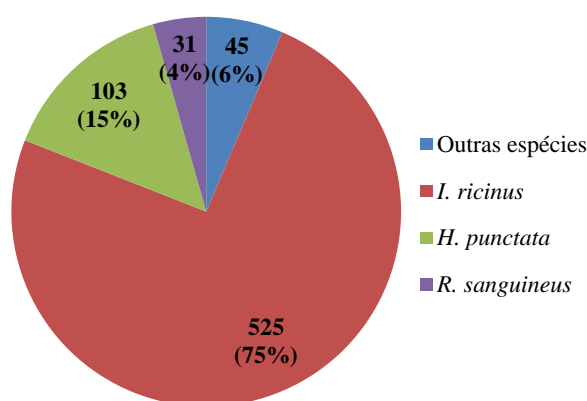


Figura 42: Representação gráfica da distribuição das espécies analisadas por *nested-PCR* (n = 704). "Outras espécies" engloba: *D. marginatus*, *H. inermis*, *Hy. lusitanicum*, *Hy. marginatum*, e *I. hexagonus*.

Tabela 4: Distribuição das carraças analisadas por ambas as *nested-PCR*, de acordo com a espécie.

Espécie	Total
<i>D. marginatus</i>	5
<i>H. inermis</i>	13
<i>H. punctata</i>	103
<i>Hy. lusitanicum</i>	24
<i>Hy. marginatum</i>	1
<i>I. hexagonus</i>	2
<i>I. ricinus</i>	525
<i>R. sanguineus</i>	31
Total	n = 704

Das 904 amostras analisadas exclusivamente pela *nested-PCR* 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, cinco carraças do género *Rhipicephalus* foram positivas, tendo sido uma delas enviada para sequenciação.

Para as restantes 704 amostras de ixodídeos testadas, verificou-se que 4,8% das carraças (34 carraças) foram positivas por *nested-PCR*. Os resultados obtidos encontram-se descritos no Quadro 14.

Quadro 14: Resultados obtidos pelas técnicas de *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e *flaB* (n = 704).

		<i>Nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA		Total
		Positivos	Negativos	
<i>Nested</i> -PCR <i>flaB</i>	Positivos	5 (0,71%)	9 (1,28%)	14 (2%)
	Negativos	20 (0,28%)	670 (95,17%)	690 (98%)
Total		25 (3,55%)	679 (96,45%)	704

Aos resultados obtidos nas duas abordagens de *nested*-PCR, aplicou-se o teste estatístico “kappa” (*k*), que demonstrou a existência de uma concordância de 99 % ($k=0,999$) entre as duas abordagens de *nested*-PCR.

Um total de 20 carraças foram positivas apenas pela *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, e todas foram capturadas na vegetação da TNM. Apenas pela *nested*-PCR *flaB* foram positivos nove ixodídeos (oito colhidos na TNM e um na QTB). De referir que cinco ninfas da espécie *I. ricinus* capturadas na vegetação da TNM, foram positivas em ambas as *nested*-PCR (Figura 43 e Quadro 15).

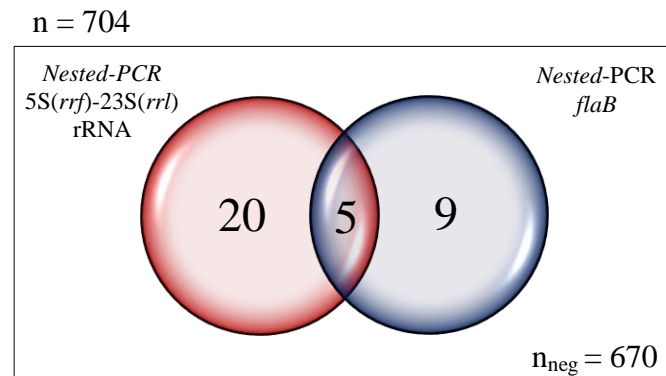


Figura 43: Gráfico de Venn representativo dos resultados obtidos pelas duas abordagens de *nested*-PCR (n = 704).

Quadro 15: Distribuição do número de positivos por *nested*-PCR de acordo com o estágio, espécie e origem de cada ixodídeo.

<i>Nested</i> -PCR	Total de Positivos	Nº /estádio/espécie	Origem
5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rRNA	20	18 ninfas <i>I. ricinus</i>	Vegetação (TNM)
		1 fêmea <i>I. ricinus</i>	Vegetação (TNM)
		1 macho <i>H. punctata</i>	Vegetação (TNM)
<i>flaB</i>	9	2 ninfas <i>I. ricinus</i>	Vegetação (TNM)
		1 fêmea <i>I. ricinus</i>	Gamo (TNM)
		1 pool de larvas <i>H. punctata</i>	Vegetação (TNM)
		3 ninfas <i>H. punctata</i>	Vegetação (TNM)
		1 fêmea <i>R. sanguineus</i>	Vegetação (TNM)
		1 fêmea <i>H. punctata</i>	Veado (QTB)
		5 ninfas <i>I. ricinus</i>	Vegetação (TNM)
Ambos	5		

Verificou-se assim, que as 34 carraças positivas por *nested*-PCR, incluíam 27 espécimes *I. ricinus*, seis *H. punctata* e um *R. sanguineus*. Por RFLP, foram analisados os 24 espécimes de *I. ricinus* positivos pela *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA.

2.2.1.2. GENOTIPAGEM POR RFLP

Da análise por RFLP das oito estirpes de referência com a enzima *MseI*, resultaram seis padrões de restrição distintos (Figura 44), correspondentes às seis genoespécies testadas: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. bavariensis* e *B. valaisiana*. Estes padrões foram usados como termo de comparação para a identificação das genoespécies presentes nas amostras de ixodídeos positivas na *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA.

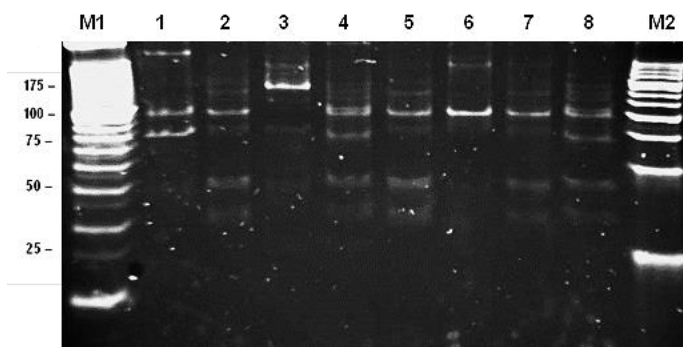


Figura 44: Padrões de restrição com a enzima *MseI* das estirpes de referência: M1 - Marcador *GeneRuler* 50 – 1031pb (Fermentas); 1 - PGau (*B. afzelii*); 2 - B31 (*B. burgdorferi* s.s.); 3 - VS116 (*B. valaisiana*); 4 - PoTiBL37 (*B. lusitaniae*); 5 - VS219 (*B. burgdorferi* s.s.); 6 - Pbi bava (*B. bavariensis*); 7 - Pbi (*B. garinii*); 8 - PoHL1 (*B. lusitaniae*); M2 - Marcador *Bioline HyperLadder* 25 – 500 pb.

Na análise por RFLP das carraças positivas, resultaram cinco padrões de restrição diferentes. Assim, por comparação com os resultados obtidos na análise da bateria de referência obtiveram-se os resultados representados na Figura 45:

- Padrão 1 (poço 1 e 3) – possível infecção mista por *B. lusitaniae* e *B. valaisiana*;
- Padrão 2 (poço 2) – *B. afzelii*;
- Padrão 3 (poços 4, 5, 7 e 8) – *B. garinii*;
- Padrão 4 (poço 6) – *B. bavariensis*;
- Padrão 5 (poço 9) – *B. lusitaniae*.

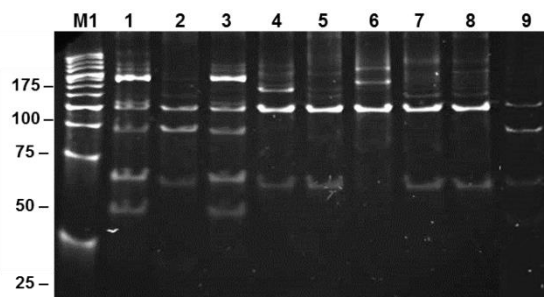


Figura 45: Alguns padrões de restrição resultantes da análise por RFLP das amostras de ixodídeos: M1 - Marcador Bioline *HyperLadder* 25 – 500pb; 1 e 3 – infecção mista por *B. valaisiana* e *B. lusitaniae*; 2 – *B. afzelii*; 4, 5, 7 e 8 – *B. garinii*; 6 – *B. bavariensis*; e 9 – *B. lusitaniae*.

Verificou-se assim que, quatro carraças apresentavam o padrão 1 (*B. lusitaniae* + *B. valaisiana*); 16 carraças revelaram o padrão 3 (*B. garinii*); duas carraças corresponderam ao padrão de restrição 4 (*B. bavariensis*); uma carraça revelou o padrão 2 (*B. afzelii*), e uma revelou o padrão 5 (*B. lusitaniae*). Deste modo, estes resultados correspondem a 66,7% das carraças infetadas com *B. garinii*, 16,7% com infecção mista por *B. lusitaniae* e *B. valaisiana*, 8,3% com *B. bavariensis*, 4,2% infetadas com *B. afzelii* e 4,2% apenas com *B. lusitaniae*.

Os produtos de amplificação por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA das seis amostras humanas selecionadas (três soros e três LCR's), também foram analisadas por RFLP. Como resultado obtiveram-se três padrões de restrição distintos (Figura 46): poço 1, 2 e 4 mostrou um padrão de restrição correspondente a *B. garinii*; poço 3 e 5 revelaram um padrão idêntico ao de *B. lusitaniae*; e no poço 6 identificou-se um padrão de restrição análogo ao de *B. valaisiana*.

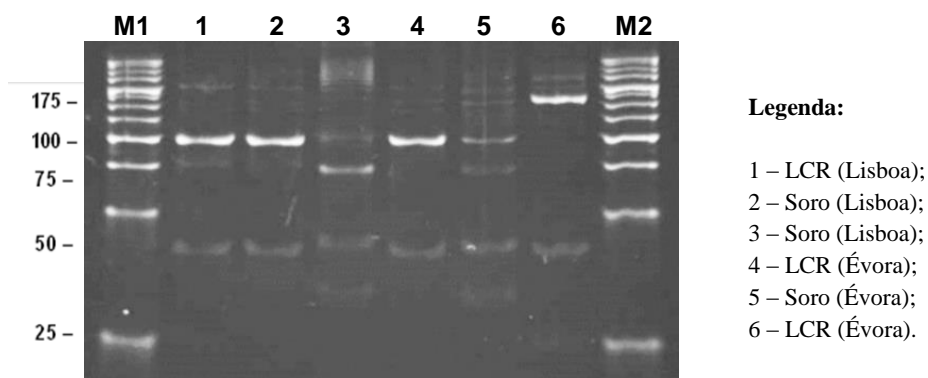


Figura 46: Resultados da RFLP das seis amostras humanas: M1 - Marcador Bioline *HyperLadder* 25–500pb; 1,2 e 4 – *B. garinii*; 3 e 5 – *B. lusitaniae*; e 6 – *B. valaisiana*; M2 - Marcador Bioline *HyperLadder* 25–500pb.

Deste modo, em três amostras humanas (duas de LCR e uma de soro) foi detetado DNA de *B. garinii*; dois soros apresentaram DNA de *B. lusitaniae*; e uma amostra de LCR apresentou DNA de *B. valaisiana*.

2.2.1.3. SEQUENCIAÇÃO

Foram enviados para sequenciação os produtos de amplificação por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA de cinco carraças da espécie *I. ricinus* correspondentes aos cinco padrões de restrição obtidos pela análise RFLP. Foi também sequenciado o produto de amplificação da carraça *Rhipicephalus* spp. analisada apenas pela *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA (Quadro 16).

Quadro 16: Carraças cujos produtos de amplificação por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA foram analisados por sequenciação e resultados obtidos na mesma.

Sequenciação				
Nº carraça	Padrão RFLP	Estádio/Espécie	Genoespécie	Homologia
192*	1	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. lusitaniae</i>	97 %
396*	1	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. lusitaniae</i>	98 %
349	2	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	98 %
427	3	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. garinii</i>	98 %
428	4	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. bavariensis</i> (<i>B. garinii</i>)	90 % (92%)
525	5	Ninfa <i>I. ricinus</i>	<i>B. lusitaniae</i>	97 %
587**	-----	Macho <i>Rhipicephalus</i> sp	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	91%

*carraças com infeção mista por *B. lusitaniae* e *B. valaisiana* segundo os resultados obtidos pela análise RFLP.

**carraça apenas analisada por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA para deteção de DNA borreliano, o resultado da sequenciação apenas indicou tratar-se de DNA de *B. burgdorferi* s.l..

2.2.2. qPCR

Nesta fase inicial de optimização da técnica de qPCR, foram testados os *primers* e sondas previamente desenhados para os controlos internos tendo como alvo o gene da β -actina para amostras de mamíferos, e o gene 18S para as carraças, verificando-se o seu correto funcionamento, pela deteção da emissão de fluorescência, indicando assim a existência de amplificação.

Também foram testados todos os *primers* e sondas desenhados para ‘qPCR género’, e ‘qPCR genoespécies’. Nas reações para o género e para *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* e *B. afzelii*, obteve-se a emissão de fluorescência esperada. Contudo, as aferições para a sonda de *B. garinii* encontram-se ainda em curso.

As optimizações da sensibilidade da qPCR para o género e da qPCR para as genoespécies encontram-se em desenvolvimento, no entanto, foi possível obter-se um limite de detecção de 1 bactéria/reacção para o género e para *B. burgdorferi* s.s. (Figura 47 e Figura 48), e até 10^2 bactérias/reacção para *B. afzelii* e *B. lusitaniae* (Figura 50 e Figura 49).

qPCR Género

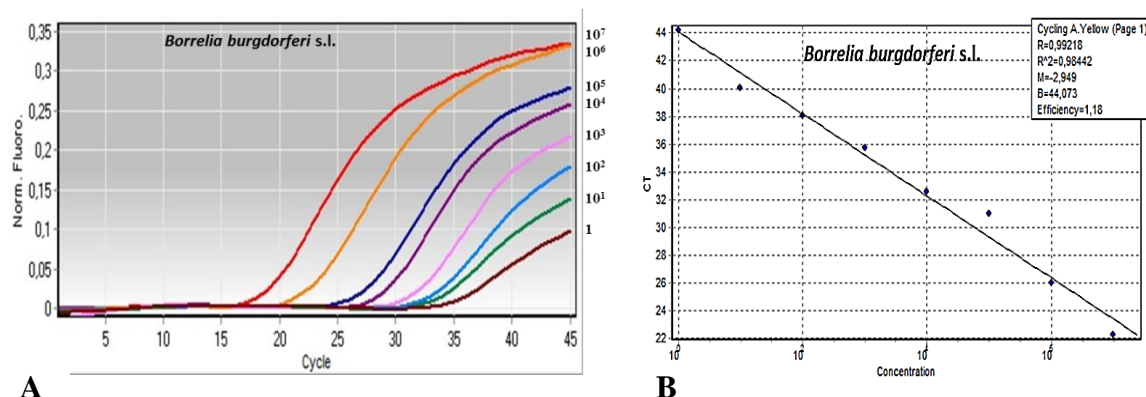


Figura 47: Representação gráfica dos resultados da qPCR para o género: A) limite de detecção = 1 bactéria/reacção; B) curva padrão.

qPCR Genoespécies

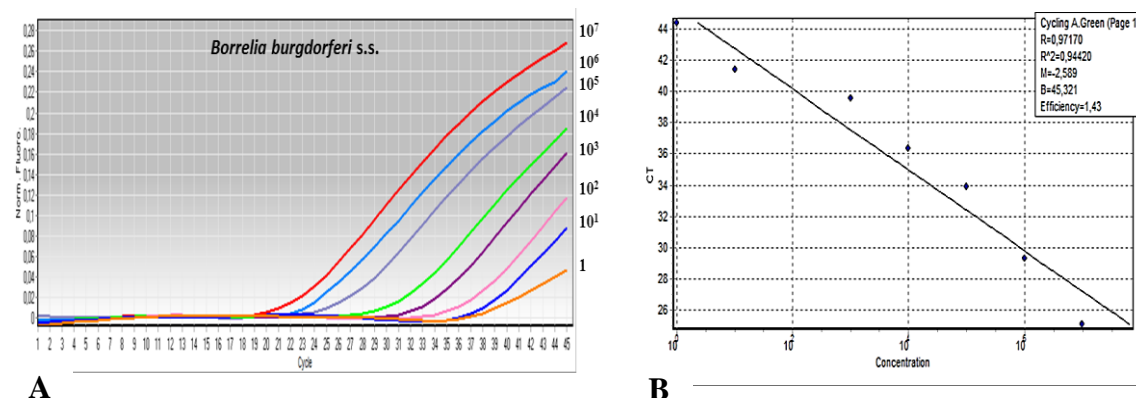


Figura 48: Representação gráfica dos resultados da qPCR para *B. burgdorferi* s.s.: A) limite de detecção = 1 bactéria/reacção; B) curva padrão.

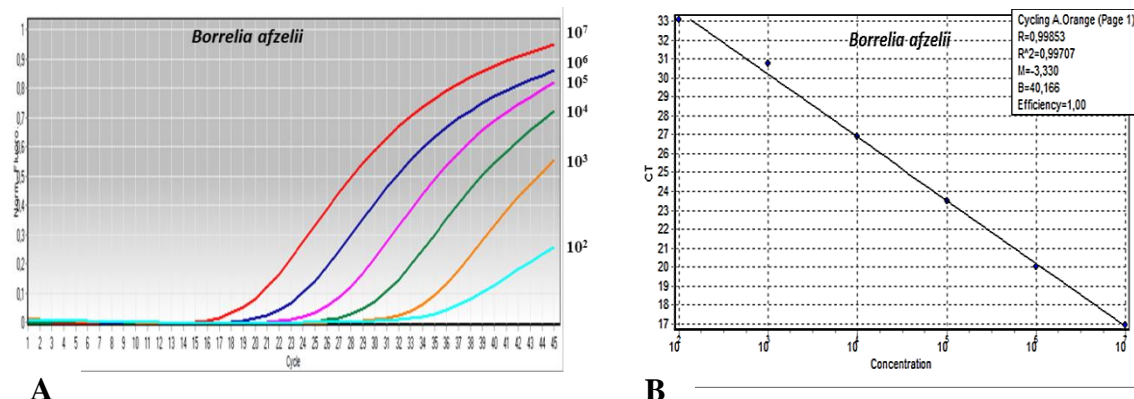


Figura 50: Representação gráfica dos resultados da qPCR para *B. afzelii*: A) limite de detecção = 10^2 bactérias/reação; B) curva padrão.

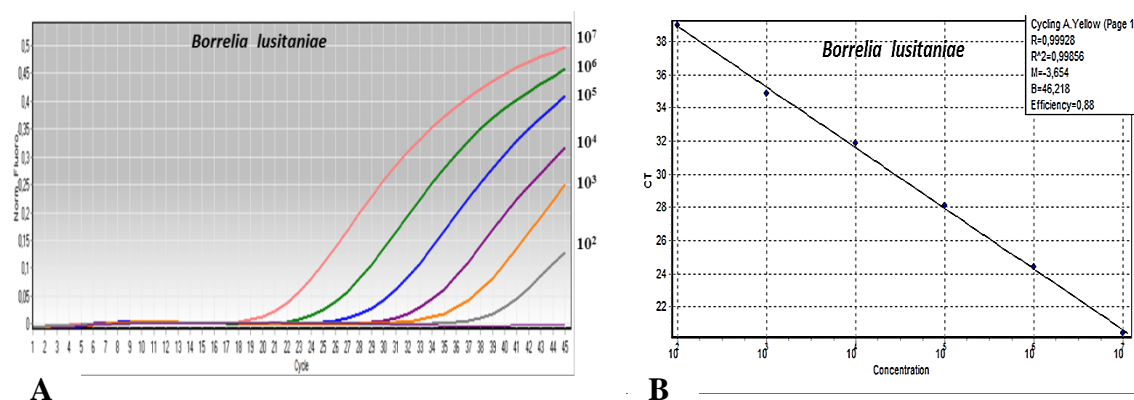


Figura 49: Representação gráfica dos resultados da qPCR para *B. lusitaniae*: A) limite de detecção = 10^2 bactérias/reação; B) curva padrão.

As curvas padrão para a quantificação do DNA de *Borrelia*, foram construídas com base nos valores obtidos na determinação da sensibilidade da reação qPCR, e os valores do coeficiente de correlação e eficiência encontram-se descritos no Quadro 17.

Quadro 17: Valor do coeficiente de correlação (r^2) e eficiência (%) para cada reação de qPCR.

qPCR <i>flaB</i>	Coeficiente de correlação (r^2)	Eficiência (%)
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	0,98	118*
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	0,94	143*
<i>B. lusitaniae</i>	0,99	88
<i>B. afzelii</i>	0,99	100

(*emissão inespecífica de fluorescência.)

Quanto à especificidade da qPCR, não se verificou amplificação para qualquer um dos microrganismos *Leptospira* spp, *Treponema pallidum*, *Plasmodium* spp e *Leishmania* spp, pelo que a técnica de qPCR apresentou uma especificidade de 100%.

IV – DISCUSSÃO

Nos últimos anos, em Portugal, tem-se verificado um crescente interesse pelo estudo da BL e dos respetivos agentes etiológicos, não só devido à grande diversidade de manifestações clínicas que muitas vezes mimetizam outros quadros clínicos de difícil diagnóstico, mas também pela própria complexidade da sua ecoepidemiologia. Por outro lado, a abordagem laboratorial tem-se revelado cada vez mais um instrumento fundamental não só no diagnóstico, mas também no controlo das populações de vetores (carraças), procurando estabelecer possíveis áreas de risco, o que tem levado à incessante busca por tecnologias mais rápidas, sensíveis e eficazes.

A investigação desenvolvida, que está na origem da presente dissertação, teve como principal intuito a utilização de técnicas moleculares para a deteção de espiroquetas pertencentes ao complexo *B.b.s.l.*, especialmente em carraças, e também em amostras de doentes, de forma a conhecer a atual distribuição e diversidade de genoespécies circulantes em Portugal continental.

Para a realização deste estudo, para além do trabalho laboratorial, foi necessário realizar trabalho de campo, que se revelou uma peça fundamental para a aquisição do material de estudo (carraças), permitindo o conhecimento da fauna ixodideológica existente no território continental, e respetivos habitats. Todo este trabalho foi desenvolvido entre maio de 2012 e junho de 2013, conseguindo-se recolher mais de quatro mil espécimes de carraças na vegetação e nos hospedeiros animais. Do total da população de carraças, quase cinquenta por cento foi capturada na TNM, situada no distrito de Lisboa, o que se justifica pela sua proximidade relativamente ao laboratório, mas também pela reconhecida presença do vetor *I. ricinus*, assim como do agente da BL nesta reserva, de acordo com diversos autores, entre os quais, Norte e col. (2012) (51).

A escolha dos distritos selecionados para a realização das capturas de ixodídeos em Portugal continental, deveu-se sobretudo à elevada densidade de carraças e à presença do vetor *I. ricinus* registadas nos mesmos, como demonstrado em estudos anteriormente realizados por Baptista (2006), e Santos-Silva e col. (2011) (1, 64).

Da identificação laboratorial dos referidos espécimes, verificou-se que os géneros *Rhipicephalus* e *Ixodes* foram os mais prevalentes, correspondendo a 45% e 37% dos

ixodídeos, respetivamente, seguindo-se os géneros *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Dermacentor*. Como tal, dentro de cada género capturado, as espécies mais prevalentes foram *R. sanguineus*, *I. ricinus*, *H. punctata*, *Hy. lusitanicum*, e do género *Dermacentor* apenas se capturaram carraças pertencentes à espécie *D. marginatus*. A maioria dos ixodídeos recolhidos foram adultos, com maior prevalência de fêmeas, seguindo-se as ninfas e larvas. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Santos-Silva e col. (2011). Além disso, o mesmo trabalho também mostrou que as espécies mais comuns foram *R. sanguineus*, *I. ricinus*, *D. marginatus*, embora a espécie *Hy. marginatum* tenha sido a espécie mais prevalente do género *Hyalomma* (64).

No presente trabalho os distritos onde se obteve maior número de carraças foram por ordem decrescente, Lisboa, Faro, e Setúbal, facto também corroborado por Santos-Silva e col. (2011), indicando que os mesmos distritos se encontram entre os cinco com maior densidade de carraças. Por outro lado, dos nove distritos selecionados, a presença do vetor *I. ricinus* foi detetada em seis deles: Braga, Vila real, Aveiro, Lisboa, Setúbal e Faro. A localização destes distritos é representativa das regiões norte, centro e sul de Portugal continental, o que permite inferir que a espécie *I. ricinus* se encontra distribuída por todo o território continental, tal como foi demonstrado em estudos anteriores onde esta espécie de ixodídeos vetores de *B.b.s.l.*, foi reportada em todos os distritos portugueses (Santos-Silva e col. (2011)). No mesmo estudo, a espécie *I. acuminatus* apenas foi reportada no distrito de Leira, apesar de se admitir que a distribuição geográfica desta espécie seja mais ampla (64). De facto, no decurso da presente investigação, foi capturado um espécime de *I. acuminatus* no distrito de Braga.

De acordo com Schwarz e col. (2012), a atividade da espécie *I. ricinus* é favorecida pela temperatura do ar entre 7°C e 24°C e humidade relativa de 45-100%. Além disso a sua distribuição e abundância dependem de fatores abióticos e bióticos tais como microclima, habitat (vegetação) e dinâmica dos seus hospedeiros (68). Apesar de ao longo do tempo, se ter verificado um decréscimo dos valores da temperatura e, sobretudo, da humidade relativa, tendo sido registados os valores médios de 21,7°C e 51,6% respetivamente, os quais se situam, segundo Schwarz e col. (2012), dentro do intervalo considerado ótimo para a sobrevivência e manutenção do ciclo de vida de *I. ricinus* (68). Ainda de acordo com os mesmos autores, uma vez que a sobrevivência e

desenvolvimento das carraças estão fortemente associados às condições climáticas, verificando-se que o fenómeno do aquecimento global parece influenciar significativamente a densidade e distribuição das mesmas, pelo que a elevação da temperatura favorece a sobrevivência, atividade e desenvolvimento dos ixodídeos.

No que diz respeito à presença de ixodídeos em hospedeiros animais, a maioria das carraças foram recolhidas de cães e gamos/veados. Pela identificação laboratorial das espécies ixodideológicas obtidas nestes mamíferos, verificou-se que as espécies de carraças encontradas nos mesmos estão de acordo com Santos-Silva e col. (2011 e 2006) (64, 71). Na verdade, espécies como *I. hexagonus* e *I. ricinus* têm especial tropismo por mamíferos silváticos. Contudo, a ocorrência no presente estudo, de *I. hexagonus* em cães (distrito de Vila Real) e de *I. ricinus* em gatos (distritos de Lisboa e Faro), mostrou que as referidas espécies também podem ser encontradas a parasitar animais domésticos, associação também encontrada no norte e centro da Europa (64, 71).

De acordo com Dantas-Torres e col. (2013), a importância da espécie *I. ricinus* como vetor resulta da sua baixa especificidade para os hospedeiros, podendo infestar todos os animais que lhe sejam acessíveis, tal como mamíferos, aves e répteis, sendo a principal espécie de carraças a parasitar humanos no continente europeu. Além disso, pode ser responsável pela transmissão de vários agentes patogénicos tais como vírus, bactérias e parasitas (10).

Tendo em conta a importância da referida espécie na transmissão das espiroquetas pertencentes ao complexo *B.b.s.l.*, na Europa e em especial em Portugal, esta espécie foi analisada na presente investigação quanto aos principais estádios de desenvolvimento das carraças, de acordo com as estações do ano. A maioria dos espécimes de *I. ricinus* foi capturada na TNM, que apresenta um microclima com todas as condições de temperatura e humidade relativa indispensáveis à sobrevivência da espécie. Do estudo da sazonalidade do vetor *I. ricinus*, verificou-se um pico de maior atividade dos adultos no outono, das ninfas no inverno e das larvas no verão, tal como foi evidenciado anteriormente (*vide* “Resultados”, Figura 39). Segundo Baptista (2006), a atividade sazonal de *I. ricinus* depende de vários fatores tais como a abundância de hospedeiros, clima, vegetação e fenómeno de diapausa, tendo sido encontradas diferenças nos

padrões de sazonalidade, por vários autores em diversos países. Ainda de acordo com a mesma autora, as populações de ninfas e adultos de *I. ricinus* em Portugal podem ser encontradas durante a maior parte do ano, ou mesmo durante todo o ano, com exceção das larvas que são restritas à primavera tardia e verão (1).

O trabalho de Norte e col. (2012), corrobora os resultados agora obtidos, pois também demonstrou a existência de um amplo pico de ninfas *I. ricinus* no inverno, que se estende por vários meses (51). De facto o padrão sazonal da distribuição de *I. ricinus* agora observado parece ser condicionado pela influência do microclima da TNM, uma vez que a maioria da amostra foi capturada neste local. Além disso, verificou-se um decréscimo na população de coelhos (uma das populações de hospedeiros intermédios das ninfas) nesta Reserva, facto que também poderá explicar o elevado número das mesmas capturadas no inverno que, na ausência de refeição sanguínea, não fizeram a muda para o estágio adulto.

Por sua vez, o estágio de desenvolvimento da espécie *I. ricinus* mais prevalente foi o ninfal, seguindo-se os adultos e por último as larvas. De facto, os estádios imaturos (larvas e ninfas) foram os que apresentaram maior prevalência com cerca de 63% do total da amostra. Esta elevada prevalência contribui para um maior risco de transmissão de *B.b.s.l.* pois, segundo Collares-Pereira e col. (2000), são as ninfas que correspondem a um maior risco de transmissão, devido às suas reduzidas dimensões, passando despercebidas à grande maioria da população, sobretudo quando não alertada para tal (7).

Foi também avaliada a possível associação entre as variáveis “vento” e “visibilidade”, *versus* “estádio de desenvolvimento” dos espécimes de *I. ricinus* capturados na vegetação. Quanto à variável “precipitação”, todas as capturas foram realizadas em dias com precipitação “nula”. Assim, de acordo com os resultados obtidos pelo teste Qui-quadrado, verificou-se que para as duas variáveis “vento” e “visibilidade”, existe uma diferença significativa quanto ao “estádio de desenvolvimento” dos referidos espécimes, pelo que se infere que o mesmo depende diretamente das referidas variáveis.

No contexto laboratorial, e para a deteção de DNA borreliano nos ixodídeos capturados, utilizaram-se duas abordagens de *nested*-PCR: uma, tendo como alvo o

espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e outra, tendo como alvo o gene *flaB*, que revelaram uma sensibilidade de 10^2 e 10 bactérias/ml, respetivamente, o que aponta a última abordagem como a mais vantajosa. Estes resultados estão de acordo com Wodecka e col. (2010), que verificaram uma maior sensibilidade da *nested*-PCR tendo como alvo o gene *flaB*, comparativamente aos genes ribossomais (87).

Das carraças analisadas apenas por *nested*-PCR 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA, cinco carraças do género *Rhipicephalus* mostraram a presença de DNA borreliano, sendo que apenas uma revelou quantidade de DNA suficiente para ser analisada por sequenciação. Em contrapartida, das carraças analisadas pelas duas abordagens de *nested*-PCR, verificou-se que cerca de cinco por cento estavam infetadas por *B.b.s.l.*, sendo a maioria ninfas da espécie *I. ricinus*, e ainda carraças das espécies *H. punctata* e *R. sanguineus*. De referir também, que todas as carraças positivas foram provenientes da TNM (distrito de Lisboa), com exceção de uma fêmea *H. punctata* que foi recolhida de um veado na QTB (distrito de Lisboa, concelho de Azambuja). Estes dados são análogos aos observados no estudo de Baptista (2006), no qual, além do vetor *I. ricinus*, outras espécies de ixodídeos provenientes da TNM estavam igualmente infetadas com *B.b.s.l.* (*Rhipicephalus* spp, *Dermacentor* spp, e *Haemaphysalis* spp). Acresce ainda o facto de, tal como nos estudos de Baptista (2006) e Schwarz e col. (2012), também realizados em reservas naturais (o primeiro em Portugal na TNM, e o segundo na Alemanha) (1, 68), no presente estudo ter revelado a maior taxa de infeção por *B.b.s.l.* em ninfas de *I. ricinus*. De acordo com Estrada-Peña e col. (2011), o facto do estágio larvar da referida espécie adquirir as espiroquetas de um hospedeiro infetado e subsequentemente transmiti-lo às populações de hospedeiros suscetíveis sob a forma de ninfa, pode ajudar a explicar as taxas de infeção encontradas no referido estágio. Em comparação, as formas adultas são mais limitadas enquanto vetores, uma vez que se alimentam principalmente em animais de grande porte que não são reservatórios competentes (19).

A taxa de infeção vetorial encontrada por Baptista (2006) em Portugal continental foi de 11%, porém, no presente trabalho verificou-se um decréscimo da mesma. Isto pode dever-se à maior amostragem analisada pela referida autora, e ao facto do trabalho de captura ter sido desenvolvido durante um período temporal mais longo, o que permite inferir que no presente estudo, um aumento da amostragem permitiria alcançar

valores semelhantes. Além disso, de acordo com Schwarz e col. (2012), sabe-se que no continente europeu nas últimas décadas tem-se registado um aumento da prevalência de *B.b.s.l.* em várias regiões, o que associado à maior abundância do vetor *I. ricinus*, contribui para um aumento do risco de transmissão destas espiroquetas aos humanos, com o consequente aumento do número de casos de doença. Ainda de acordo com Baptista (2006), muitas vezes a diminuição das populações de reservatórios de *B.b.s.l.* em habitats onde também existam hospedeiros que não sejam reservatórios competentes como o veado, pode levar ao chamado efeito de diluição, provocando o decréscimo da taxa de infeção das carraças e da prevalência destas espiroquetas (68).

Da análise estatística pelo teste *k* dos resultados obtidos nas duas abordagens de *nested*-PCR, obteve-se um valor de 0,999, o que significa que os resultados dos dois ensaios têm uma concordância de 99%, apesar das diferenças de sensibilidade verificada entre eles.

Segundo Stanek e col. (2011), a técnica de PCR-RFLP tem-se revelado um método eficiente na discriminação de espécies e mesmo subespécies, sendo que quando aplicada ao espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA é um método rápido e simples para a tipagem molecular de genoespécies de *B.b.s.l.* (75).

Dos espécimes de *I. ricinus* analisados por RFLP, verificou-se a infeção dos mesmos por espiroquetas representantes de cinco genoespécies diferentes, tendo sido a espécie *B. garinii* a mais prevalente, o que corrobora dados anteriores de Collares-Pereira e col. (2003) (9). Contudo, Baptista (2006) no seu trabalho identificou *B. lusitaniae* como sendo a genoespécie mais prevalente, seguida de *B. valaisiana*, e de *B. garinii*, e a menos prevalente, *B. afzelii* (1). De acordo com Schwarz e col. (2012), a prevalência e distribuição das genoespécies de *Borrelia* dependem fortemente da dinâmica local dos hospedeiros, devido à sua competência como reservatórios, pelo que alterações nestas populações podem levar a mudanças nas genoespécies circulantes. Segundo os mesmos autores, em países como Portugal, Eslováquia, Letónia, Alemanha, e Reino Unido, as genoespécies *B. garinii* (incluindo *B. bavariensis*), *B. afzelii* e *B. valaisiana* estão entre as que apresentam maior prevalência. Além disso, nos seus estudos também encontraram as cinco espécies *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, e *B. lusitaniae* a infetar carraças da espécie *I. ricinus*, sendo *B. garinii* a mais prevalente

(68), o que vem apoiar os resultados agora obtidos neste trabalho, em que todas estas genoespécies foram encontradas a infetar os referidos ixodídeos.

Na análise por RFLP das amostras humanas, três (duas de LCR e uma de soro) apresentaram DNA de *B. garinii*, duas de soro foram positivas para *B. lusitaniae*, e uma amostra de LCR foi positiva para *B. valaisiana*. Estes resultados revelam que, tal como para as carraças, também nos casos de doença as espiroquetas de *B. garinii* foram as mais prevalentes. Além disso, das três amostras humanas com resultado positivo para *B. garinii*, duas foram obtidas de doentes do distrito de Lisboa e uma de um doente do distrito de Évora. Todos estes dados permitem reforçar a ideia de que *B. garinii* deverá ser uma das genoespécies mais prevalentes em Portugal continental. No entanto, a realização de estudos mais aprofundados em outras regiões do país, não só em carraças *I. ricinus*, como também em doentes, seria importante para se perceber melhor a distribuição desta e de outras genoespécies circulantes em território nacional.

De acordo com Vollmer e col. (2013), *B. garinii* e *B. bavariensis* são as espécies mais associadas a casos de neuroborreliose (82), e como tal, no presente estudo a genoespécie *B. garinii* foi detetada principalmente em amostras de LCR de doentes, assim como *B. valaisiana*, que segundo Schwarz e col. (2012) também já foi associada a casos de neuroborreliose (68). Tal como refere Shamasna e col. (2012), apesar dos conhecimentos adquiridos sobre a BL, em Portugal não se conhece a verdadeira prevalência da mesma, muito devido à subnotificação e sobretudo ao subdiagnóstico, apesar do reconhecimento da sua importância a nível mundial e de se tratar de uma doença emergente (70). Muitas vezes a explicação reside na ausência de um quadro clínico específico associado à doença, mimetizando outras doenças e situações clínicas. Como exemplo, surge a esclerose múltipla, que segundo Seixas e col. (2009), é uma doença neurológica cada vez mais frequente em Portugal, com uma prevalência estimada de 60 casos/100 000 habitantes, segundo dados da União Europeia (69), e cuja sintomatologia apresenta grande similaridade com os casos de neuroborreliose. Na verdade, a maior prevalência de *B. garinii* em Portugal continental, espécie que apresenta especial tropismo para o sistema nervoso central e que está frequentemente envolvida nos casos de neuroborreliose, poderá indicar que alguns casos diagnosticados

como esclerose múltipla, possam ser casos de BL. De facto, estudos futuros poderão ajudar a compreender melhor esta dualidade diagnóstica.

Por outro lado, a existência de infeções mistas por *B. lusitaniae* e *B. valaisiana* nas carraças analisadas, pode ser explicada pelo facto destas duas espécies terem as aves como um dos principais reservatórios. Segundo Schwarz e col. (2012), as aves são os principais reservatórios de *B. valaisiana*, enquanto *B. lusitaniae* pode estar associada às aves e aos lagartos (68). Assim sendo, ambas as espécies podem persistir no mesmo reservatório e os ixodídeos ao realizarem a refeição sanguínea são infetados por espiroquetas destas duas espécies de *B.b.s.l.*, ou por outro lado, devido à vasta gama de hospedeiros de *I. ricinus*, estes ixodídeos podem alimentar-se em diferentes hospedeiros e infetarem-se com bactérias de mais do que uma genoespécie.

Tal como no trabalho de Jenkins e col. (2012), na presente investigação também foram sequenciados os produtos de amplificação resultantes da *nested*-PCR do espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA (32). De acordo com os resultados obtidos da sequenciação, as genoespécies *B. lusitaniae*, *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. bavariensis* (*B. garinii*), evidenciaram valores de homologia superiores a 90%, confirmando assim, os resultados previamente obtidos na avaliação dos padrões de restrição por RFLP (1, 2, 3, 4 e 5, respetivamente). Contudo, apesar do resultado da sequenciação indicar que o padrão 5 corresponde à genoespécie *B. lusitaniae*, a observação e comparação dos padrões de restrição obtidos para esta espécie e para *B. valaisiana* permitiu concluir que, muito provavelmente, o padrão 5 corresponde a infeção mista por *B. lusitaniae* e *B. valaisiana*. Deste modo, a sequenciação permitiu confirmar os resultados obtidos na genotipagem por RFLP, contribuindo para uma identificação mais fiável das diferentes genoespécies. Por sua vez, a única carraça do género *Rhipicephalus* que foi sequenciada, revelou estar infetada com espiroquetas de *B.b.s.l.*, não tendo sido possível determinar a genoespécie.

Diversas técnicas de PCR em tempo real têm sido desenvolvidas para a identificação e quantificação de espécies de *B.b.s.l.*, tendo como alvo diferentes genes, tais como *recA*, *p66*, *OspA*, *hbb* e *flaB* (21, 32, 52, 55). Ao nível dos genes *recA* e *p66*, os protocolos têm sido incapazes de distinguir três das principais espécies de *B.b.s.l.* na Europa (*B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*). Um exemplo, é o trabalho de Casati e

col. (2004), que desenvolveram uma PCR em tempo real, cujo alvo molecular foi o gene *recA*, com o objetivo de pesquisar a diversidade de genoespécies de *B.b.s.l.* em carraças capturadas na Suíça (4). No entanto este método apresentou alguns problemas, sendo necessário efetuar uma posterior sequenciação dos produtos de PCR em tempo real para diferenciação das genoespécies. Em contrapartida, um outro método desenvolvido para o gene *OspA* por Rauter e col. (2002), foi bastante satisfatório na detecção e diferenciação das três referidas genoespécies de *B.b.s.l.*, no entanto, não privilegiou a espécie *B. lusitaniae* que tem apresentado, nos últimos anos, uma elevada prevalência na Europa, tendo já sido isolada em Portugal tanto no vetor como nos humanos (8).

Mais recentemente têm sido desenvolvidos estudos tendo como alvo os genes *hbb* e *flaB* (21, 32, 52). Inicialmente Portnoi e col. (2006), conseguiram distinguir cinco genoespécies (*B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s.), através da análise da temperatura de “melting”, tendo como alvo molecular o gene *hbb* (52). Mais tarde Ferdin e col. (2012), utilizaram a mesma abordagem, tendo conseguido distinguir uma sexta genoespécie, *B. spielmanii*, além das cinco anteriormente referidas (21). No entanto, em ambos os estudos a temperatura de “melting” apresentou valores muito próximos entre si, com uma variação de 1 a 3°C, o que pode pôr em causa os resultados, pois essa variação pode corresponder efetivamente a diferentes genoespécies de *B.b.s.l.*, ou pode estar relacionada com oscilações de temperatura inerentes ao próprio aparelho de PCR em tempo real utilizado nos ensaios.

Ao nível do gene *flaB*, Jenkins e col. (2012), desenvolveram uma qPCR com sondas TaqMan® para a diferenciação de todas as genoespécies de *Borrelia*, incluindo *B. recurrentis*, agente causal da febre recorrente. Contudo, ocorreram certas limitações ao nível da inexistência no GeneBank de sequências da região alvo para as genoespécies *B. americana*, *B. bissetii*, *B. californiensis*, *B. kurtenbachii*, *B. spielmanii* e *B. yangtze*, e sequências incompletas para *B. japonica*, *B. andersonii* e *B. sinica*. Nas amostras analisadas no referido estudo, apenas foi identificada *B. valaisiana*, sendo pertinente uma maior e mais diversificada amostragem para a correta validação desta técnica (32).

No estudo agora desenvolvido, o gene *flaB* foi também o selecionado para a realização da técnica de PCR em tempo real com sondas TaqMan®, com o objetivo de diferenciar e quantificar numa única reação, as quatro espécies de *B.b.s.l.* mais

prevalentes na Europa, tornando mais rápido e eficiente não só o diagnóstico laboratorial como a investigação em BL e respetivos agentes etiológicos.

Na fase inicial de optimização da técnica de qPCR, foram testados os *primers* e sondas previamente desenhados para os vários ensaios, verificando-se na qPCR para o género e na qPCR para as genoespécies *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* e *B. afzelii*, a emissão de fluorescência esperada. Contudo, as aferições para a sonda de *B. garinii* encontram-se ainda em curso.

Os limites de deteção da ‘qPCR género’ e ‘qPCR genoespécies’, foram bastante satisfatórios para *B.b.s.l.* e *B. burgdorferi* s.s., contudo, no caso de *B. afzelii* e *B. lusitaniae* a sensibilidade dos ensaios revelou-se inferior. Este resultado, no entanto, pode estar condicionado por vários fatores tais como: *i)* a extração de DNA das culturas de referência ser ainda pouco eficiente, obtendo-se uma baixa concentração final de DNA, o que influencia diretamente as diluições seriadas; *ii)* a temperatura e o tempo de hibridação para as respetivas sondas não serem os mais adequados; e *iii)* existência de problemas nas sequências escolhidas para o desenho das sondas. Apesar destas limitações, a técnica de qPCR em optimização revelou uma especificidade de 100% para *B.b.s.l.*

De facto, as técnicas de PCR em tempo real têm-se revelado rápidas e sensíveis, possibilitando a tipagem das genoespécies e a quantificação de *B.b.s.l.* não só em amostras humanas, como em carraças (32).

V – CONCLUSÃO

A BL é uma doença emergente, que atinge a população portuguesa e que urge diagnosticar e notificar, de modo a conhecer a sua verdadeira amplitude. Na Europa sabe-se que o número anual de casos da doença tem aumentado, facto associado à expansão da população de vetores (carraças), prevendo-se que nas próximas décadas a BL se torne um preocupante problema de Saúde Pública. Deste modo, no contexto nacional, é de grande importância determinar a distribuição do principal vetor *I. ricinus*, para o que o presente estudo procurou contribuir, quer determinando a ampla distribuição do mesmo em Portugal continental, quer atualizando o conhecimento da atual distribuição da fauna ixodideológica. Outro aspeto de grande importância evidenciado neste trabalho foi a perceção de que as formas imaturas de *I. ricinus*, sobretudo as ninfas, podem representar um risco mais elevado de transmissão de *B.b.s.l.* aos humanos, face às taxas de infeção apresentadas.

Também os efeitos das alterações climáticas e dos biótopos na distribuição sazonal do vetor *I. ricinus* têm-se revelado como importantes focos de investigação, especialmente no que diz respeito à identificação de novos paradigmas para a prevenção e o controlo da doença de Lyme. Além disso, a abundância e diversidade de reservatórios competentes de *B.b.s.l.* nos habitats de *I. ricinus* parece contribuir diretamente para a prevalência, distribuição e tipo de genoespécies circulantes. De acordo com os resultados do presente estudo, tudo indica que *B. garinii* será mesmo a genoespécie mais prevalente em Portugal continental, tendo-se também detetado e identificado outras, como *B. lusitaniae*, *B. bavariensis*, *B. valaisiana* e *B. afzelii*, tanto no vetor como em amostras humanas.

Ao concluir-se este trabalho e num contexto de perspetivas futuras, seria de grande importância o desenvolvimento de estudos mais aprofundados em Portugal que possam contribuir para o conhecimento da distribuição do vetor *I. ricinus* e das populações de hospedeiros e de reservatórios competentes de *B.b.s.l.* permitindo, desta forma, compreender melhor a ecoepidemiologia da BL no país, de modo a estabelecerem-se possíveis áreas de risco e metodologias de controlo e prevenção. Paralelamente, são necessários mais estudos que substanciem o conhecimento da verdadeira prevalência da BL em Portugal, assim como das principais genoespécies

circulantes. A aposta em técnicas laboratoriais mais robustas, rápidas e sensíveis, tais como a qPCR, podem contribuir grandemente não só para a investigação da doença de Lyme, como para o tratamento e diagnóstico da mesma em tempo útil, contribuindo para minimizar o seu impacto na população humana.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Baptista, S.** 2006. Lyme Borreliosis in Portugal: Study on Vector(s), Agent(s) and Risk Factors. Universidade Nova de Lisboa.
2. **Barbour, A. G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A. G., Diuk-Wasser, M. A., Fish, D. and J. I. Tsao.** 2009. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **81**:1120–31.
3. **Calderaro, A., Montecchini, S., Gorrini, C., Piccolo, G., Chezzi, C. and G. Dettori.** 2011. Presence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in samples of subjects in an area of the Northern Italy in the period 2002 – 2008. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **70**:455–460.
4. **Casati, S., Bernasconi, M. V., Gern, L. and J-C. Piffaretti.** 2004. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by recA gene sequence. FEMS Microbiology Letters **238**:115–23.
5. **Casjens, S. R., Fraser-liggett, C. M., Mongodin, E. F., Qiu, W., Dunn, J. J., Luft, B. J. and S. E. Schutzer.** 2011. Whole Genome Sequence of an Unusual *Borrelia burgdorferi*. Journal of Bacteriology **193**:1489–1490.
6. **Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W-G., Dunn, J. J., Luft, B. J., Fraser-Liggett, C. M. and S. E. Schutzer.** 2011. Whole-genome sequences of two *Borrelia afzelii* and two *Borrelia garinii* Lyme disease agent isolates. Journal of Bacteriology **193**:6995–6996.
7. **Collares-Pereira, M. and I. da Franca,** 2000. Borreliose de Lyme: ocorrência em Portugal. Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia **58**:107–117.
8. **Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Scha, S. M., Baptista, S., Vieira, M. L. and C. Cunham.** 2004. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. Journal of Clinical Microbiology **42**:1316–1318.
9. **Couceiro, S., Baptista, S., Da Franca, I., Gonçalves, L., Vieira, M. L. and M. Collares-Pereira,** 2003. Cultura vs PCR: que apoio ao diagnóstico de borreliose de Lyme? Acta Reumatológica Portuguesa **28**:75–82.
10. **Dantas-Torres, F. and D. Otranto.** 2013. Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. Veterinary Parasitology **192**:253–8.

11. **De Faria, A. S.** 2013. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in serum and parasitizing ixodids of the wild boar (*Sus scrofa*) in northern Portugal by nested-PCR. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
12. **De Macedo, F. W.** 1997. Detecção remota de recursos florestais em Portugal: realidades e perspectivas 1–17.
13. **De Michelis, S., Sewell, H. S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. M., Benes, V., Holmes, E. C. and K. Kurtenbach.** 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. Journal of Clinical Microbiology **38**:2128–33.
14. **Depietropaolo, D. L., Powers, J. H., Gill, J. M. and A. J. Foy.** 2005. Diagnosis of Lyme Disease. American Family Physician **72**:297–304.
15. **Derdáková, M., Beati, L., Pet’ko, B., Stanko, M. and D. Fish.** 2003. Genetic Variability within *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Established by PCR – Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the rrfA-rrlB Intergenic Spacer in *Ixodes ricinus* Ticks from the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology **69**:509–516.
16. **Ecogene.** 2013. Red Safe Nucleic Acid Stain. <http://www.ecogene.com>. Acedido em 4-07-2013.
17. **Egyed, L., Elő, P., Sréter-Lancz, Z., Széll, Z., Balogh, Z. and T. Sréter.** 2012. Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. Ticks and Tick-Borne Diseases **3**:90–4.
18. **Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J-L. and A. R. Walker.** 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species, 1^a ed. Universidade de Zaragoza, Zaragoza.
19. **Estrada-Peña, A., Ortega, C., Sánchez, N., Desimone, L., Sudre, B., Suk, J. E. and J. C. Semenza.** 2011. Correlation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the western palearctic. Applied and Environmental Microbiology **77**:3838–45.
20. **European Concerted Action on Lyme Borreliosis (Eucalb).** 2013. Lyme Borreliosis. <http://www.eucalb.com>. Acedido em 17-06-2013.
21. **Ferdin, J., Cerar, T., Strle, F. and E. Ruzić-Sabljić.** 2010. Evaluation of real-time PCR targeting hbb gene for *Borrelia* species identification. Journal of Microbiological Methods **82**:115–9.
22. **Florestar. net.** 2013. A floresta nativa. <http://www.florestar.net>. Acedido em 24-06-2013.

23. **Franke, J., Hildebrandt, A. and W. Dorn.** 2013. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes--updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **4**:11–25.
24. **Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O. and J. C. Venter.** 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**:580–6.
25. **Fukunaga, M., Sohnaka, M. and Y. Yanagihara.** 1993. Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *Journal of General Microbiology* **139**:1141–1146.
26. **Gern, L., Hu, C. M., Kocianova, E., Vyrostekova, V. and J. Rehacek.** 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *European Journal of Epidemiology* **15**:665–9.
27. **Handeland, K., Qviller, L., Vikøren, T., Viljugrein, H., Lillehaug, A. and R. K. Davidson.** 2013. *Ixodes ricinus* infestation in free-ranging cervids in Norway-A study based upon ear examinations of hunted animals. *Veterinary Parasitology* **195**:142–9.
28. **Herrmann, C., Voordouw, M. J. and L. Gern.** 2013. *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease , *Borrelia burgdorferi* sensu lato , have higher energy reserves. *International Journal for Parasitology* **43**:477–483.
29. **Heymann, W. R. and D. L. Ellis.** 2012. *Borrelia burgdorferi* Infections in the United States. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* **5**:18–28.
30. **Invitrogen.** 2002. Sensitive, specific real-time PCR without probes. <http://www.gene-quantification.de/invitrogen-lux-brochure.pdf>. Acedido em 19-6-13.
31. **Ivacic, L., Reed, K. D., Mitchell, P. D. and N. Ghebranious.** 2007. A LightCycler TaqMan assay for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **57**:137–143.
32. **Jenkins, A., Hvidsten, D., Matussek, A., Lindgren, P-E., Stuen, S. and B-E. Kristiansen.** 2012. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Norway: evaluation of a PCR test targeting the chromosomal flaB gene. *Experimental & Applied Acarology* **58**:431–9.

33. **Junior, I. M., Zahdi, M. R., Filho, A. B. and C. R. Cruz** 2007. Doença de Lyme: diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade* **3**:76–81.
34. **Karami, A.** 2012. Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*, p. 1–26. In Karami, A (ed.), *Lyme Disease*. InTech.
35. **Kean, I. R. and K. L. Irvine.** 2013. Lyme disease : aetiopathogenesis, factors for disease development and control. *Inflammopharmacology* **21**:101–11.
36. **Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J. I., Margos, G., Fish, D. and N. H. Ogden.** 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature reviews. Microbiology* **4**:660–9.
37. **Kurtenbach, K., Sewell, H., Ogden, N. H., Sarah, E., Nuttall, P. A. and S.E. Randolph.** 1998. Serum Complement Sensitivity as a Key Factor in Lyme Disease Ecology. *American Society for Microbiology*. **66**:1248–51.
38. **Lee, S. H., Kim, B. J., Kim, J. H., Park, K. H., Yeo, S. J., Kim, S. J. and Y. H.Kook.** 2000. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from Korea by 16S rDNA sequence analysis and PCR-RFLP analysis of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 2**:857–63.
39. **Liu, S., Yuan, C., Cui, Y-F., Li, B-X., Wu, L-J. and Y. Liu,** 2012. Investigation of *Borrelia* spp. in ticks (Acari: Ixodidae) at the border crossings between China and Russia in Heilongjiang Province, China. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **5**:459–64.
40. **MADRP.** Plano Estratégico Nacional de Desenvolvimento Rural. Relatório 2007-2013.
41. **Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L. and J. Gray.** 2011. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS microbiology reviews* **36**:837–61.
42. **Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R. S., Cornet, M. and V. Fingerle.** 2011. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-borne Diseases* **1**:151–158.
43. **Margos, G., Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M. and K. Kurtenbach.** 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:5410–6.

44. **Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H. and D. Fish.** 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases **11**:1545–63.
45. **Marques, A. R.** 2010. Lyme disease: a review. Current Allergy and Asthma Reports **10**:13–20.
46. **Marta, F.** 2009. Borreliose de Lyme em Portugal:(novos) aspectos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infecção humana. Faculdade de Ciências.
47. **Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J., Golovljova, I., Jaenson, T., Jensen, J-K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H. and L.Vial. Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W.** 2013. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasites & vectors **6**:1.
48. **Movila, A., Toderas, I. and H. V. Dubinina.** 2012. Zoonotic Peculiarities of *Borrelia burgdorferi* s . l . : Vectors Competence and Vertebrate Host Specificity, p. 27–54. In Karami, A (ed.), Lyme Disease.
49. **National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).** 2008. Lyme Disease: Finding the Cause of Lyme Disease. <http://www.niaid.nih.gov/topics/lymeDisease/research/Pages/cause.aspx>. Acedido em 16-05-2013.
50. **Norris, S. J.** 2012. How do lyme borrelia organisms cause disease? The quest for virulence determinants. The Open Neurology Journal **6**:119–23.
51. **Norte, A. C., Lopes de Carvalho, I., Ramos, J. A., Gonçalves, M., Gern, L. and M. S. Nuncio.** 2012. Diversity and seasonal patterns of ticks parasitizing wild birds in western Portugal. Experimental & Applied Acarology **58**:327–39.
52. **Portnoi, D., Sertour, N., Ferquel, E., Garnier, M., Baranton, G. and D. Postic.** 2006. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the hbb gene sequence. FEMS Microbiology Letters **259**:35–40.
53. **Radolf, J., Caimano, M., Stevenson, B. and L.T. Hu.** 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. Nature Reviews Microbiology **10**:87–99.
54. **Ranka, R., Bormane, A., Salmina, K. and V. Baumanis.** 2004. Identification of Three Clinically Relevant *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Amplicons. American Society for Microbiology **42**:1444–1449.

55. **Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Hartung, T. and M. Engele.** 2002. Distribution of Clinically Relevant *Borrelia* Genospecies in Ticks Assessed by a Novel , Distribution of Clinically Relevant *Borrelia* Genospecies in Ticks Assessed by a Novel , Single-Run , Real-Time PCR. *Clinical Microbiology* **40**:36–43.
56. **Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. and R. Cartuyvels.** 2009. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **23**:145–151.
57. **Rheumatology A. C.** 2009. Lyme Disease: Bell's palsy. <http://images.rheumatology.org/search.php?searchField=KEYWORD&searchstring=%2522bell's%20palsy%2522>. Acedido em 10-06-2013.
58. **Richter, D., Schröder, B., Hartmann, N. K. and F-R. Matuschka.** 2013. Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site. *FEMS Microbiology Ecology* **83**:738–44.
59. **Rijpkema, S. G., Molkenboer, M. J., Schouls, L. M., Jongejan, F. and J. F. Schellekens.** 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:3091–5.
60. **Rizzoli, A., Hauffe, H., Carpi, G., Vourc, H. G., Neteler, M. and R. Rosa.** 2011. Lyme borreliosis in Europe. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **16**:1–8.
61. **Rosa, P., Tilly, K. and P. Stewart.** 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature reviews. Microbiology* **3**:129–43.
62. **Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. and J. H. Oliver.** 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **2**:123–8.
63. **Santos, M. and V. H. Jr.** 2010. Borreliose de Lyme. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **85**:930–938.
64. **Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. and F. Bacellar.** 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental & Applied Acarology* **55**:85–121.
65. **Santos-Silva, M. M., Santos, A. S., De Carvalho, I. L., De Sousa, R., Alves, M. J. and S. Nuncio.** 2013. Relatório REVIVE 2012 - Ixodídeos Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa.



66. **Savic, S.** 2012. Discovering Lyme Disease in Ticks and Dogs in Serbia–Detection and Diagnostic Methods, p. 95–112. *In* Lyme Disease.
67. **Schwan, T. G. and J. Piesman.** 2002. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging Infectious Diseases* **8**:115–21.
68. **Schwarz, A., Honig, V., Vavrusková, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A. and G. A. Schaub.** 2012. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasites & Vectors* **5**:1–15.
69. **Seixas, D., Galhardo, V. and M. J. Sá.** 2009. DOR NA ESCLEROSE MÚLTIPLA Caracterização de uma População Portuguesa de 85 Doentes. *Acta Médica Portuguesa* **22**:233–240.
70. **Shamasna, M., Nunes, J., Cortez, J., Valente, C., Pissara, F. and G. Gonçalves.** 2012. Neuroborreliose: uma forma de apresentação atípica. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **8**:35–40.
71. **Silva, M. M., Santos, A. S., Formosinho, P., Bacellar, F., Pública, S., Margarida, M. and S. Silva.** 2006. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal **19**:39–48.
72. **Singh, S. K. and H. J. Girschick.** 2004. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet Infectious Diseases* **4**:575–583.
73. **Skuballa, J., Petney, T., Pfäffle, M., Oehme, R., Hartelt, K., Fingerle, V., Kimmig, P. and H. Taraschewski.** 2012. Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **3**:8–13.
74. **Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K-P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., Kristoferitsch, W., O’Connell, S., Ornstein, K., Strle, F. and J. Gray.** 2011. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**:69–79.
75. **Stanek, G. and M. Reiter.** 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**:487–93.
76. **Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. and F. Strle.** 2012. Lyme borreliosis. *Lancet* **379**:461–73.

77. **Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K. and P. A .Rosa.** 2005. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* **53**:1–13.
78. **Stuff. O. M.** 2012. Lyme Disease: Bull's eye rash. <http://studentosteopathicmedicine.tumblr.com/page/3>. Acedido em 10-06-2013.
79. **Tapada Nacional de Mafra.** 2013. Fauna e Flora. [http:// www.tapadademafra.pt](http://www.tapadademafra.pt). Acedido em 24-06-2013.
80. **The Center for Food Security and Public Health (CFSPH).** 2011. Lyme Disease. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lyme_disease.pdf. Acedido em 18-06-2013.
81. **Thursfield M.** 1990. *Epidemiologia Veterinária*. Acribia. Zaragoza.
82. **Vollmer, S. A., Feil, E. J., Chu, C-Y., Raper, S. L., Cao, W-C., Kurtenbach, K. and G. Margos.** 2013. Spatial spread and demographic expansion of Lyme borreliosis spirochaetes in Eurasia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **14**:147–55.
83. **Von Baehr, V., Doebis, C., Volk, H-D. and R. von Baehr.** 2012. The lymphocyte transformation test for borrelia detects active lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. *The Open Neurology Journal* **6**:104–12.
84. **Wang, G., Dam, A. P. Van and I. Schwartz.** 1999. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato : Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato : Taxonomic , Epidemiological , and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews* **12**:633–653.
85. **Wilhelmsson, P., Fryland, L., Börjesson, S., Nordgren, J., Bergström, S., Ernerudh, J., Forsberg, P. and P-E. Lindgren.** 2010. Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:4169–76.
86. **Wodecka, B.** 2011. *flaB* Gene as a Molecular Marker for Distinct Identification of *Borrelia* Species in Environmental Samples by the PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:7088–7092.
87. **Wodecka, B., Leońska, A. and B. Skotarczak.** 2010. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *Journal of Medical Microbiology* **59**:309–14.

88. **Wood, C. L. and K. D. Lafferty.** 2013. Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends in Ecology & Evolution* **28**:239–47.
89. **Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Che, R., Niu, Q., Li, Y., Liu, J., Ma, M., Ren, Q., Liu, A., Luo, J. and H. Yin.** 2012. Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **73**:80–3.
90. **Zhang, F., Gong, Z., Zhang, J. and Z. Liu.** 2010. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from Gansu, northwestern China. *BMC microbiology* **10**:157.

VII - ANEXOS

ANEXO 1

		BOLETIM DE COLHEITAS DE IXODIDEOS			
Coletor: _____					
Data: _____	Hora: _____	Colheita Nº: _____			
Concelho: _____		Freguesia: _____			
Localidade: _____		Coordenadas GPS: _____			
Temperatura: _____ °C		Humidade relativa: _____ %			
Condições atmosféricas:					
Precipitação					
Nula <input type="checkbox"/>	Fraca <input type="checkbox"/>	Moderada <input type="checkbox"/>	Forte <input type="checkbox"/>		
Visibilidade					
Nula <input type="checkbox"/>	Fraca <input type="checkbox"/>	Moderada <input type="checkbox"/>	Boa <input type="checkbox"/>		
Vento					
Nulo <input type="checkbox"/>	Fraco <input type="checkbox"/>	Moderado <input type="checkbox"/>	Forte <input type="checkbox"/>		
Método de Colheita:					
1. Vegetação					
Número de coletores 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> Mais de 3 <input type="checkbox"/> Quantos? _____					
Esforço de captura: _____ min					
Trajeto percorrido: _____ m					
Tipo de vegetação:					
1 – Vegetação do tipo herbácea (pastagem). <input type="checkbox"/>					
2 – Vegetação do tipo arbustiva. <input type="checkbox"/>					
3 – Vegetação arborea (floresta/bosque). <input type="checkbox"/>					

2. HospedeiroHOMEM ☐CÃO ☐OUTRO ☐

QUAL?

Número de hospedeiros pesquisados:

Estimativa do número de ixodídeos que parasitam o animal: 1 - 4 ☐ 11 - 20 ☐ > 50 ☐5 - 10 ☐ 21 - 50 ☐

Local de remoção no hospedeiro:

Habitat/Utilização Humana:1 – Floresta abandonada ☐2 – Pastagem ☐3 – Reserva Natural ☐4 – Zona de Caça ☐5 – Limite de zona agrícola ☐6 – Limite habitação ☐7 – Jardim Público / Parque de Merendas ☐8 – Outra _____ ☐**Notas:**

ANEXO 2

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS

Observador(es): _____

DADOS DA COLHEITA Nº: _____

Animal / solo: _____

Total de ixodídeos: _____

Data de recolha: _____

Localidade: _____

Idade do animal : Jovem ☐ Sub-adulto ☐ Adulto ☐ Sexo: M ☐ F ☐ Gestante: S ☐ N ☐**IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS**

Data de observação: _____

Gênero: _____

Espécie: _____

Características: _____

Número: _____

Larvas: _____

Ninfas: _____

Adultos: _____

Total Machos: _____

Total Fêmeas: _____

Fêmeas engorgitadas: _____

Gênero: _____

Espécie: _____

Características: _____

Número: _____

Larvas: _____

Ninfas: _____

Adultos: _____

Total Machos: _____

Total Fêmeas: _____

Fêmeas engorgitadas: _____

Gênero: _____

Espécie: _____

Características: _____

Número: _____

Larvas: _____

Ninfas: _____

Adultos: _____

Total Machos: _____

Total Fêmeas: _____

Fêmeas engorgitadas: _____

ANEXO 3

Anexo II



UNIDADE DE MICROBIOLOGIA MÉDICA
GRUPO DE LEPTOSPIROSE E BORRELIÓSE DE LYME
 Instituto de Higiene e Medicina Tropical
 Rua da Junqueira 100
 1349-008 Lisboa – Portugal
 (Tel.: 213652640/80 / Fax: 213632105 / E-mail: vieira@ihmt.unl.pt)

Informação para a população

A unidade de Microbiologia Médica, **Grupo de Leptospiriose e Borreliose de Lyme** do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, iniciou recentemente um estudo no âmbito do doutoramento da aluna Mónica Nunes, que se intitula: "Avaliação da distribuição e diversidade das genospecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. em Portugal, através do desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico". Os objetivos deste estudo são: i) atualizar a distribuição e diversidade das espécies de *B. burgdorferi* s.l., nas carraças, na população humana e ainda em algumas espécies animais; ii) avaliar a diversidade de genospecies e relacioná-las com os diferentes padrões clínicos; iii) desenvolver ferramentas de diagnóstico, tendo como alvo as espécies de *Borrelia* mais prevalentes, explorando-se a tecnologia de "Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification" combinada com a cromatografia de fluxo lateral em papel.

A Borreliose de Lyme (BL) é uma importante zoonose, causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), e a transmissão ao humano ocorre através da mordedura de **carraças** que se encontram em áreas florestadas um pouco por todo o país. A epidemiologia e clínica são complexas e o diagnóstico difícil. Em Portugal é uma doença subnotificada. Os testes laboratoriais para a BL têm vindo a evoluir, no entanto, são dispendiosos e exigem pessoal qualificado e instrumentação complexa, sendo indispensável desenvolver testes mais acessíveis, padronizados e simples.

Assim, para o sucesso deste estudo **precisamos da sua contribuição**, e para tal basta que nos faculte cerca de 6 ml de **sangue** de forma a podermos realizar os testes laboratoriais necessários. Estes testes **não terão qualquer custo** para si, dado que serão totalmente suportados pelo laboratório no âmbito do projeto.

Obrigada pela sua colaboração.

Maria Luísa Vieira
 e Mónica Nunes / IHMT/UNL

Anexo II



UNIDADE DE MICROBIOLOGIA MÉDICA
GRUPO DE LEPTOSPIROSE E BORRELIOSE DE LYME
 Instituto de Higiene e Medicina Tropical
 Rua da Junqueira 100
 1349-008 Lisboa – Portugal
 (Tel.: 213652640/60 / Fax: 213632105 / E-mail: vieira@ihmt.unl.pt)

Diagnóstico Laboratorial da Borreliose de Lyme

Data de Recepção Lab: __/__/20__ N° Lab: B __/__ (__ª amostra)

Data da colheita: __/__/20__

Material enviado: Soro ☐ Líquor ☐ Outros ☐

Colheitas anteriores? Sim ☐ - N° Lab B __/__; Não ☐

Nome do doente: _____
 Idade: _____ Tel: _____
 Morada: _____
 Código Postal: _____ - _____ Concelho: _____
 Data da consulta/ Internamento: __/__/20__
 Hospital: _____ Serviço: _____ Cama: _____
 Médico assistente: _____

Informação epidemiológica relevante

Ocupação profissional: _____ Atividades de lazer: _____; outras: _____

Exposição a zonas florestadas ou arbustivas: Sim ☐ onde? _____ Não ☐

Mordeduras de carraça: Sim ☐ (há __ dias/meses/anos) Não ☐ Não sabe ☐

Origem do doente: zona urbana ☐ zona rural ☐

Contacto com: animais domésticos ☐ quais _____; roedores ☐ _____

outros animais ☐ _____

Viagens recentes: _____

Informação clínica relevante

Início dos sintomas: ____ dias ☐; meses ☐; anos ☐

Sinais e Sintomas: Febre ☐; Cefaleias ☐; Meningismo ☐; Paralisia facial ☐; EM ☐

Artralgias ☐; Artrite ☐; Cardite ☐; outros _____

Exantema? Sim ☐ n° lesões ____; tamanho médio: ____ cm; duração (dias): ____; Não ☐

Antibioterapia? Sim ☐ (____), início: ____ dias; Não ☐

Diagnóstico clínico presuntivo: _____

Anexo II



UNIDADE DE MICROBIOLOGIA MÉDICA
GRUPO DE LEPTOSPIROSE E BORRELIÓSE DE LYME
 Instituto de Higiene e Medicina Tropical
 Rua da Junqueira 100
 1349-008 Lisboa – Portugal
 (Tel.: 213652640/60 / Fax: 213632105 / E-mail: vieira@ihmt.unl.pt)

Consentimento informado

AO INDIVÍDUO/ REPRESENTANTE:

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo do documento que recebeu. Não hesite em solicitar mais informações se não estiver completamente esclarecido. Se entender que tudo está em conformidade e se estiver de acordo com a proposta que lhe é feita, então assine este documento.

Declaro ter compreendido os objectivos do projecto de investigação que me foi proposto e explicado pela doutoranda Mónica Nunes; ter-me sido dada oportunidade de fazer todas as perguntas sobre o assunto e para todas elas ter obtido resposta esclarecedora; ter-me sido garantido que não haverá prejuízo para os meus direitos assistenciais se eu recusar esta solicitação; e ter-me sido dado tempo suficiente para reflectir sobre esta proposta. Autorizo o acto indicado, bem como os procedimentos directamente relacionados que sejam necessários no meu próprio interesse e justificados por razões clínicas fundamentadas.

_____ (localidade), __/__/____ NOME _____

Assinatura _____

Se não for o próprio a assinar:

Nome: _____

BI/C C n.º: _____, data/validade __/__/____

Morada _____

Grau de parentesco ou tipo de representação: _____